Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus von Paraquat an der isoliert perfundierten Rattenleber und dessen Beeinflussung durch einen SOD-aktiven Cu-Komplex [$Cu(Tyr)_2$].

Ayman Hashem

1981

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. D. Hegner

Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus von Paraquat an der isoliert perfundierten Rattenleber und dessen Beeinflussung durch einen SOD-aktiven Cu-Komplex $[Cu(Tyr)_2]$.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ayman Hashem
aus Alexandria/Ägypten

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. D. Hegner

Korreferent: Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meiner Frau
Meinen Eltern
In Liebe und
D a n k b a r k e i t

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0075

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Paraquat 1

1.1.1. Allgemeine Bedeutung von Paraquat 1

1.1.2. Klinische und pathologische Aspekte der Paraquat-Vergiftung 3

1.1.3. Biochemische und pathobiochemische Aspekte der Paraquat-Vergiftung 7

1.1.3.1. Herbizide Wirkung von Paraquat 7

1.1.3.2. Mögliche Wirkungsmechanismen in Säugetieren 8

1.1.4. Therapie der Paraquat-Vergiftung 12

1.2. Lipidperoxidation

1.2.1. Chemischer Verlauf der Lipidperoxidation 14

1.2.2. Lipidperoxidation in biologischen Systemen 16

1.2.3. Folgen und biologische Bedeutung der Lipidperoxidation 17

1.2.4. Schutzmechanismen gegen Lipidperoxidation 17

1.3. Aktivierung von freien Radikalen in biologischen Systemen 18

1.3.1. Kontrolle von Radikalreaktionen in biologischen Systemen 20

1.4. Superoxiddismutasen 21

1.4.1. Superoxiddismutase-aktive Verbindungen 22

1.5. Problemstellung 23

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Reagentien und Tiermaterial 24

2.2. Leberperfusion 25
2.2.1. Einführung 25
2.2.2. Perfusionssystem in der vorliegenden Arbeit 27
2.2.3. Perfusionsmedien 27
2.2.4. Durchführung der Perfusion 28
2.2.5. Messung des Sauerstoffverbrauchs 28

2.3. Isolierung der Mitochondrien und Mikrosomen 29

2.4. Lipidanalyse 29
2.4.1. Lipidextraktion 29
2.4.2. Auftrennung der Phospholipide 30
2.4.3. Darstellung der Fettsäuremethylester 31
2.4.4. Gaschromatographische Analyse 31
2.4.5. Dien-Konjugation 32
2.4.6. Phosphatbestimmung 32

2.5. Biochemische Bestimmungen 32
2.5.1. Proteinbestimmung 32
2.5.2. Malondialdehydbestimmung 33
2.5.3. Bestimmung des oxidierten Glutathions "GSSG" im Perfusat 33

2.6. Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse 34

2.7. Aufbau der Versuche 35

3. ERGEBNISSE

3.1. Aufnahme von $Cu(Tyr)_2$ 36

3.2. Verteilung von $Cu(Tyr)_2$ in den Leberzell-kompartimenten 39

3.3. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf den Sauerstoffverbrauch in der isoliert perfundierten Leber 41

3.4. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat-induzierten Veränderungen in der isoliert perfundierten Leber 44

3.4.1. Sauerstoffverbrauch 44

3.4.2. Austritt von GSSG in das Perfusat 47

3.4.3. Lipid- und Proteingehalt der Mitochondrien und Mikrosomen 49

3.4.4. Dien-Konjugation der Lipide 51

3.4.5. Phosphatgehalt der Lipide 53

3.4.6. Malondialdehydbildung 54

3.5. Einfluß von Paraquat und $Cu(Tyr)_2$ auf das Fettsäuremuster der Lipide und Phospholipide aus Mitochondrien und Mikrosomen 55

3.5.1. Einfluß von Paraquat 56

3.5.2. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ 56

3.5.3. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat-Wirkung 56

4. DISKUSSION

4.1. Einfluß von Paraquat auf die isoliert perfundierte Rattenleber 60

4.1.1. Sauerstoffverbrauch 60

4.1.2. GSH-Oxidation 61

4.1.3. Lipid- und Phospholipidgehalt 62

4.1.4. Dien-Konjugation 63

4.1.5. Malondialdehydbilung 64

4.1.6. Fettsäuremuster der Lipide bzw. Phospholipide 65

4.2. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die idoliert perfundierte Leber 67

4.2.1. Aufnahme und Verteilung 67

4.2.2. Sauerstoffverbrauch 68

4.2.3. Einfluß auf die untersuchten Parameter 68

4.3. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat-Wirkung 69

4.3.1. Sauerstoffverbrauch 69

4.3.2. GSH-Oxidation 69

4.3.3. Einfluß auf andere Paraquat Effekte 71

4.4. Beurteilung der Anwendung von $Cu(Tyr)_2$ als Antidot bei Paraquat-Vergiftungen 73

5. ZUSAMMENFASSUNG 74

6. SUMMARY 75

LITERATURVERZEICHNIS 76

Verwendete Abkürzungen

EDTA	Äthylendiamintetraazetat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiertes Glutathion)
MDA	Malondialdehyd
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid phosphat, reduziert
$O_2^{-\cdot}$	Superoxidradikal
$^1O_2$	Singulett Sauerstoff
$^{\cdot}OH$	Hydroxylradikal
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidyläthanolamin
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SOD	Superoxiddismutase (EC 1.15.1.1.)
TRA	Triäthanolaminhydrochlorid
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

1. EINLEITUNG

1.1. Paraquat

1.1.1. Allgemeine Bedeutung von Paraquat

Paraquat ist ein weitverbreitetes Herbizid, das seit seiner Einführung 1962 in der Landwirtschaft zunehmende Bedeutung erlangt hat. Obwohl die Substanz schon 1882 von Weidel und Russo synthetisiert wurde (90), blieb der Stoff weitgehend unbekannt. Michaelis synthetisierte Paraquat 1932 erneut und verwendete es unter dem Namen "Methyl Viologen" als Redox-Indikator (111). Erst Ende der fünfziger Jahre wurden die herbiziden Eigenschaften der Viologene bekannt. 1962 wurde Paraquat als Herbizid eingesetzt (7,19).

Chemisch handelt es sich um eine bis-quarternäre Ammoniumverbindung, (1,1' dimethyl-4,4' bipyridylium) , die aus 2 Pyridinringen mit je einer Methylgruppe in para Stellung besteht. Daher stammt die Trivialbezeichnung (PARA substituted QUAT-ernary bipyridyl) (111). Das Dichlorid ist am meisten verbreitet. Es ist eine hygroskopische, nicht flüchtige, farblose und gut wasserlösliche Substanz. Sie dissoziiert in Lösung und wird durch Sonnenlicht und Mikroorganismen im Erdboden zerstört. Wegen seiner leichten Dissoziation unterliegt es einem schnellen Basenaustausch mit Kationen und wird auf diese Weise als Herbizid unwirksam (90). Paraquat hat ein Redoxpotential von -446 mV (69) und wird daher nur schwer reduziert. Die Reduktion erfolgt in zwei 1-Elektronen übertragenden Schritten. Der erste führt zur Radikalbildung. Das ungepaarte freie Elektron bleibt über den 12 nuklearen Atomen delokalisiert (siehe Abb. 1). Diese sogenannte Resonanz ist die Ursache für die Stabili-

tät des Radikals. Der zweite Schritt, die Aufnahme des zweiten Elektrons erfordert hohen Energieaufwand und ist daher in biologischen Systemen nicht möglich (90).

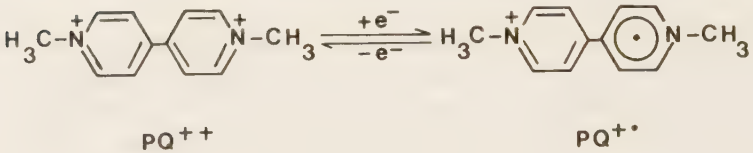


Abb. 1: Die Reduktion von Paraquat.

Bei unmittelbarem Kontakt mit dem Boden, durch Adsorption an Bodenmineralien und mirkobielle Zerstörung, verliert Paraquat seine herbizide Wirkung (111). Die Einführung von Paraquat wurde von mehreren Autoren, darunter auch Toxikologen, infolge der relativ raschen Inaktivierung als eine Reform in der Landwirtschaft bezeichnet, wobei einem eventuellen Mißbrauch untergeordnete Bedeutung beigemessen wurde (90,111,124). Paraquat wird als Totalherbizid, Defoliant und Desikkant zur Erntehilfe bei Kartoffeln benutzt (124). Vergiftungen von Nutztieren mit Paraquat kommen selten vor (111). Paraquat wird in etwa 130 Ländern benutzt, meist in Form einer konzentrierten Lösung, aber auch in granulierter Form oder als Kombination mit Diquat, einer ähnlichen Bipyridylium-Verbindung, oder anderen Herbiziden. In der Bundesrepublik sind die 20%ige Lösung (Gramoxon ^{R}), die granulierte Form, eine Kombination von je 2,5% Paraquat und Diquat (Weedol ^{R}, Duanti ^{R}) und eine Kombination von Paraquat und Diuron, einem Harnstoffherbizid, (Gramixel ^{R}) im Handel (90).

Bei direkter Einnahme ist Paraquat extrem toxisch. 1964, zwei Jahre nach seiner Einführung, wurden in Irland die ersten Todesfälle beim Menschen durch Vergiftung mit Paraquat bekannt (19). Bis 1973 wurden 232 Fälle, die meisten in West Europa, registriert; davon 29 Opfer in der Bundesrepublik (90). Bisher wird die Zahl der Opfer auf mehrere Hundert geschätzt (7). Einer Studie (23) zufolge, sind 70 von 96 registrierten Vergiftungen tödlich verlaufen. Vergiftungsfälle kommen nicht selten in suizidaler Absicht vor, aber auch durch fahrlässige Aufbewahrung, wobei Kinder in besonderem Maße gefährdet sind (111). Die lösliche Form ist, wegen besserer Resorption, giftiger als die granulierte Form (90).

1.1.2. Klinische und pathologische Aspekte der Paraquat-Vergiftung

Der Haut- bzw. Schleimhautkontakt mit Paraquat ist meist berufsbedingt und führt zu lokalen Augen- und Hautverätzungen, Epistaxis oder Schäden von Finger- bzw. Zehenhorn (90).

Die systemische Vergiftung ist besonders kritisch zu beurteilen, da keine akuten Krankheitssymptome auftreten. Die spezifischen Symptome treten meist dann auf, wenn sich schon irreversible Gewebsveränderungen entwickelt haben (19). Im allgemeinen läuft eine typische Paraquat Vergiftung in drei Phasen ab (19):

I. Die erste Phase, 2-4 Tage ist symptomlos. Manchmal treten gastrointestinale Beschwerden und Nausea auf.
II. Die zweite Phase ist gekennzeichnet durch Pharyngitis, Laryngitis, Ösophagitis, Magen-Darm-Ulzeration, entzündliche Lungenerscheinungen, Leberschädigung mit Ikterus und akutes Nierenversagen.

III. In der dritten Phase, ab der 2. Woche, treten proliferative Lungenveränderungen mit Ödemen und Fibrose auf, die meist in der 3. Woche durch allgemeine Hypoxie und Dyspnoe zum Tode führen. In manchen Fällen verläuft die Vergiftung aber subakut, wobei der Tod binnen weniger Tage infolge eines schweren Lungenödems und Nekrose des alveolären Epithels eintritt (43,123).

Paraquat wird vom Magen-Darmtrakt schlecht (etwa 5-10% einer oralen Dosis) resorbiert (121). Von einer oralen Dosis wird etwa 93-96% in den Fäces und etwa 6% im Urin ausgeschieden (19). Trotz der geringen Resorption reichen 10-15 ml einer kommerziellen Lösung aus um einen Menschen zu töten (23). Es wurde über eine tödliche Vergiftung berichtet, in der ein gesunder Mann versehentlich einen Schluck nahm, von dem er den größten Teil sofort wieder ausspuckte (19). Die LD_{50} beträgt beim Menschen etwa 40-60 mg pro Kilogramm Körpergewicht (19). Im allgemeinen wird geschätzt, daß 1-2 g für Erwachsene zum Tode führen können (7). In der Tabelle 1 ist die orale LD_{50} für einige Tierarten zusammengefaßt (49).

Tabelle 1: Orale LD_{50} von Paraquat für verschiedene Tierarten

Tierart	orale LD_{50}
Weibliche Ratte	110-200 mg/kg
Meerschweinchen	40-80 mg/kg
Katze	35-50 mg/kg
Schaf	50-100 mg/kg
Rind	50-75 mg/kg
Haushuhn	260-380 mg/kg

Kumulation und chronische Vergiftungen wurden bei Tieren nicht beobachtet (49).

Paraquat wird im Organismus nicht biotransformiert (7) und wird nicht oder nur wenig (1,1-4,8%) in die Galle ausgeschieden (44,90). Beim Menschen erreicht Paraquat nach oraler Aufnahme die höchste Serumkonzentration innerhalb von 1-6 Stunden. Nach 24-48 Stunden ist es im Serum nicht mehr nachzuweisen (111). Bei Ratten wurden nach oraler Applikation maximale Serumwerte binnen 1/2 - 1 Stunde gefunden. Der Abfall des Serumspiegels erfolgt biphasisch. Eine kurze rasche Phase gefolgt von einer langsamen exponentiellen Phase. In der zweiten Phase ist die Konzentration im Gewebe, vor allem in der Lunge, höher als die im Serum, wobei die maximale Lungenkonzentration ihren Höhepunkt nach ca 32 Stunden erreicht. Paraquat wird in der Atemluft nicht ausgeschieden (82). Postmortal wird die höchste Konzentration in der Lunge und in den Nieren gefunden (112). Wegen der schnellen Ausscheidung und des zögernden Auftretens der Symptome wurde ursprünglich ein "hit and run" Mechanismus angenommen, der allerdings nicht bestätigt werden konnte (46,106).

Durch Vergiftung mit Paraquat werden pathologische Veränderungen in Lunge, Nieren und Leber gefunden. Es kommt zu Oligurie, Albuminurie, degenerativen Veränderungen im proximalen Tubulus mit Nekrose (44) und Schädigung der Basalmembran (67). Die Nieren akkumulieren Paraquat, jedoch weniger als die Lunge (96,112). Die Leber zeigt toxische degenerative Zellschäden (10) mit Ikterus (19) und Zellnekrose (44). Ferner wurden Anämie mit Aplasie und Störung der Erythropoese beobachtet. Diese Veränderungen sind nicht dosisabhängig und zeigen nur geringe Tendenz zur Rückbildung (68).

Die Lunge ist das Organ mit den gravierendsten pathologischen Veränderungen. Es wird angenommen, daß Paraquat mit Hilfe eines energieabhängigen Mechanismus in die Alveolarepithelien aufgenommen und angereichert wird. Innerhalb von 1-2 Tagen ist die Paraquatkonzentration in der Lunge höher als die im Plasma (59,96). Typ I und Typ II Alveolarzellen sind von der Paraquatwirkung am meisten betroffen (93,102,126). Subzellulär wurde Paraquat in allen Organellen nachgewiesen (59,122). Die häufigsten Befunde in der Lunge während der Paraquatvergiftung sind Ödeme (10,50), Fibrose (54), Schädigung des Lungenendothels (100) mit Hämorrhagie (3), Vermehrung der Alveolarmakrophagen und Fibroblasten (38). Gleichzeitig kommt es zur Abnahme von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin, das von Typ II Alveolarzellen gebildet wird und als Surfaktant dient, mit folgendem Lungenkollaps (37,43,44). In einem Fall wurde das völlige Verschwinden der spezifischen Gewebestruktur der Lunge beschrieben (9). Diese Veränderungen werden wahrscheinlich durch eine direkte Wirkung von Paraquat an den Lungengeweben hervorgerufen. In einer Studie (64) wurden auch solche Veränderungen bei lokaler Anwendung von Praquat in der Lunge festgestellt.

Im allgemeinen verläuft eine experimentelle Lungenschädigung bei Paraquatvergiftung in zwei voneinander unabhängigen Phasen (54,111):

I. Destruktive Phase: Schwellung der Typ I Alveolarzellen (Membranpneumozyten) mit Vakuolisierung und Zerstörung der Zellorganellen und hydropischer Degeneration. Die Typ II Alveolarzellen (granuläre Pneumozyten) zeigen Mitochondrienschwellung und Zerstörung des endoplasmatischen Retikulums. Diese Phase ist verbunden mit Verlust des pulmonalen Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin.

II. Proliferative Phase: Diese fängt meist 3 Tage nach der Vergiftung an und ist gekennzeichnet durch Wanderung von Mononuklearzellen, Profibroblasten und Blutmonozyten in die Alveolarräume. Binnen 7 Tagen werden die Alveolen mit diesen Zellen, die zu Fibroblasten proliferieren, gefüllt und es entwickelt sich eine Fibrose. Je nach Schwere der Vergiftung verschwindet die Lungenarchitektur total oder teilweise. Diese Phase tritt auch unabhängig von der ersten Phase auf und scheint direkt durch Paraquat stimuliert zu werden.

1.1.3. Biochemische und pathobiochemische Aspekte der Paraquatvergiftung

1.1.3.1. Herbizide Wirkung von Paraquat

Paraquat zerstört in Abhängigkeit von Licht und Sauerstoff (127) die grünen Teile der Pflanzen (111). Es wird vom Photosystem I (8), verantwortlich für die Lichtreaktion der Photosynthese, zum Radikal reduziert. Diese Reduktion erfolgt enzymatisch und ist NADPH-abhängig, sie verläuft in den Chloroplasten (111). Mit einer Geschwindigkeit von $k=7,7 \times 10^8\ M^{-1}sec^{-1}$ (35) kann das Paraquatradikal ($PQ^{+\cdot}$) sein Elektron leicht auf ein O_2-Molekül übertragen. Dabei wird das Paraquatmolekül regeneriert und wieder zu weiterer Reduktion bereitgestellt, während das Sauerstoffmolekül zum Superoxidradikal ($O_2^{-\cdot}$) reduziert wird (73,127). Die Reaktion verläuft leicht aufgrund der Redoxpotentiale der Paare $PQ/PQ^{+\cdot}$ (-446mV) und $O_2/O_2^{-\cdot}$ (-337 mV) (48,69). In Anwesenheit von Metallionen können aus dem Superoxidradikal andere aktive Sauerstoffspezies entstehen, z.B. Hydroperoxid (O_2^{2-}), das Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$) oder Singulett Sauerstoff ($^1O_2$).

Die aktiven Sauerstoffspezies sind phytotoxisch durch Zerstörung der Membranlipide (Lipidperoxidation). Sie führen zu Membranschäden mit Austritt der Zellflüssigkeit und Zelltod (35). Dieser Wirkungsmechanismus von Paraquat wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt. So wurde Malondialdehyd, ein Zerfallsprodukt der Lipidhydroperoxide, 6 Stunden nach Paraquatbehandlung (33,73), sowie das Entstehen von $O_2^{-\cdot}$ durch Paraquat in isolierten Chloroplasten (127) nachgewiesen. Ferner wurde berichtet, daß bei Behandlung mit Paraquat und Photosynthese-blockierenden Agentien, z.B. Monuron, die Paraquatwirkung aufgehoben wurde. Außerdem wurden unter anaeroben Bedingungen bei Behandlung von Pflanzen mit Paraquat die Paraquatradikale nachgewiesen (111).

1.1.3.2. Mögliche Wirkungsmechanismen in Säugetieren

Da Sauerstoff für die toxische Wirkung von Paraquat sowohl bei Tieren als auch in Pflanzen erforderlich ist, wurde vermutet, daß der Wirkungsmechanismus im tierischen Organismus dem herbiziden Mechanismus ähnlich ist. Paraquat wird durch NADPH und NADPH-Cytochrom c Reduktase zum Radikal reduziert, das seinerseits ein Sauerstoffmolekül zum Superoxidradikal reduziert. $O_2^{-\cdot}$ dismutiert entweder enzymatisch, durch Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 und O_2 oder spontan unter Bildung von Singulett Sauerstoff, der die Lipidperoxidation initiieren kann (15,16,17), (siehe Abb. 2). Diese Hypothese wurde durch zahlreiche experimentelle Studien unterstützt, aber auch angezweifelt. Die Beobachtungen, die für die genannte Hypothese sprechen sind u.a.:

1. Die Ähnlichkeit der Lungenläsionen bei Paraquatvergiftungen mit denen bei Vergiftung mit Oxidantien, z.B. O_2 und Ozon (17)
2. Entstehung von Paraquatradikalen bei anaerober Inkuba-

tion von Paraquat mit Lungen- oder Lebermikrosomen und NADPH, sowie Hemmung der Radikalbildung durch Antikörper gegen NADPH-Cytochrom c Reduktase (15,17).

3. Entstehung von Malondialdehyd (MDA) bei aerober Inkubation von Paraquat mit mikrosomalen Lipiden, NADPH und NADPH-Cyt. c Reduktase. Diese MDA-Bildung wird durch SOD und $^1O_2$- maskierende Agentien (z.B. 1,1' diphenylisobenzofuran) gehemmt (15,17).
4. Erhöhte Toleranz gegen Paraquat durch Vorbehandeln der Tiere mit Phenobarbital, das durch seinen eigenen Stoffwechsel mit Paraquat um die elektronenübertragenden Enzymsysteme konkurriert (17).
5. Erhöhte Empfindlichkeit für Paraquat, wenn die vergifteten Tiere in hyperbarer Sauerstoffatmosphäre gehalten werden (61,93). Andererseits führt die Vorbehandlung der Tiere in hyperbarer Sauerstoffatmosphäre durch Induktion der Schutzmechanismen gegen aktive Sauerstoffradikale (GSH-Peroxidase, SOD und Glucose-6-phosphatdehydrogenase), zu erhöhter Toleranz gegen Paraquat (17). Hemmung dieser Schutzmechanismen durch Selen-Mangel (die GSH-Peroxidase ist selenabhängig), Vit.E Mangel (Antioxidans), Diethylmaleat (bindet GSH) oder Triorthocresylphosphat (hemmt die GSH-Peroxidase) führt zu erhöhter Empfindlichkeit für Paraquat (17,21,28,44).
6. Erhöhte Empfindlichkeit für Paraquat durch SOD-Inhibitoren wie Diethylthiocarbamat (45).
7. Veränderung des Fettsäuremusters der Lungenlipide durch Paraquat (38).
8. Erhöhte Toleranz gegen Paraquat und Verbesserung der Lungenläsionen durch Behandlung mit SOD in vivo (2).
9. Aktivierung der Biosynthese von SOD, Erhöhung der Aktivität von Katalase und erhöhte Toleranz gegen Sauerstoff in E. coli durch Behandlung mit Paraquat (51), sowie Verstärkung der Paraquat-Toxizität durch O_2 (52).
10. Die Toxizität der Viologene in Pflanzen und Tieren ist

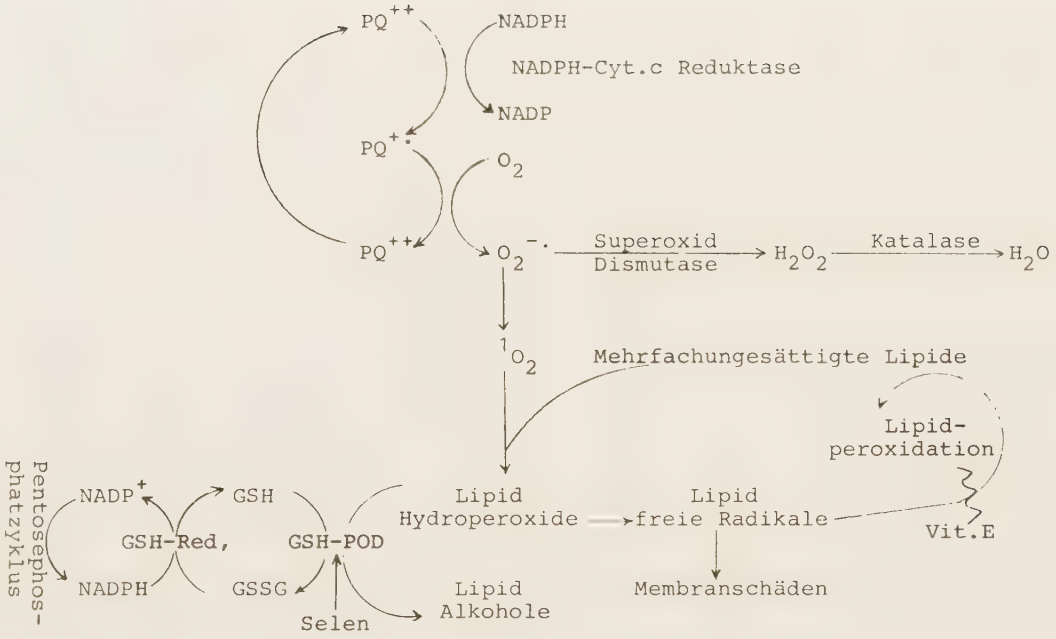


Abb. 2: Möglicher Wirkungsmechanismus der Paraquat Toxizität (Nach 17)

vom Redoxpotential abhängig (99).

11. Erhöhung der $O_2^{-\cdot}$ Produktion (gemessen an der Oxidation von Adrenalin zu Adrenochrom) durch Inkubation von Lebermikrosomen mit NADPH und Paraquat. Diese $O_2^{-\cdot}$ Produktion wird gehemmt durch Gabe von SOD in das Inkubationsmedium (29).

Folgende Beobachtungen sprechen gegen die Hypothese der Lipidperoxidation als Wirkungsmechanismus von Paraquat:

1. Menadion, ein Elektronenakzeptor, induzierte die $O_2^{-\cdot}$ Bildung aber hemmt die Lipidperoxidation in Mikrosomen (90).
2. Vorbehandlung mit N,N´diphenylen diamin, einem Antioxidans, hemmt zwar die Paraquat induzierte Lipidperoxidation, schützt aber nicht gegen seine Lethalität (107).
3. Die Äthanausscheidung in der Atemluft, ein Parameter für Lipidperoxidation, wurde durch Behandlung mit Paraquat in vivo nicht signifikant erhöht (114).
4. Unter einigen Versuchsbedingungen hemmt Paraquat die MDA-Bildung in Mikrosomen (59,113).
5. Änderung der endogenen SOD-Konzentration in E.coli, durch Wachstum in verschiedenen Medien, führt zu keiner Änderung der Empfindlichkeit oder Toleranz gegen Paraquat (109).

Andere Untersuchungen führten zu der Vermutung, daß die Toxizität von Paraquat auf die Ausschöpfung des mikrosomalen Elektronentransportsystems zurückzuführen ist (98,110, 113,126). Folgende Beobachtungen unterstützen diese Hypothese:

1. Induktion des Pentosephosphatzyklus durch Paraquat (Bereitstellung von NADPH) (120,126).
2. Beeinträchtigung der Biosynthese von Fettsäuren und Phospholipiden, besonders Lecithin, in der Lunge deutet auf eine Erschöpfung von NADPH hin (72,110). Dies führt

zur Abnahme des Surfaktant (Dipalmitoyl Phosphatidylcholin) in der Lunge (36). Diese Beobachtungen erklären die verzögerte Wirkung von Paraquat in der Lunge (113).

3. Hemmung des pulmonalen Fettsäuredesaturase Systems, eine mischfunktionelle Oxidase, die NADPH abhängig ist, durch Paraquat (79,81).

Offen bleibt auch noch die Frage, warum Paraquat in der Lunge akkumuliert. Es wurde festgestellt, daß Paraquat von der Lunge durch einen aktiven Mechanismus aufgenommen wird (126). Inkubation von Lungenschnitten mit Paraquat zeigt eine Abhängigkeit der Aufnahme von Sauerstoff. Wird O_2 durch N_2 ersetzt, wird keine Aufnahme beobachtet. Enthält die Atmosphäre wieder Sauerstoff, so steigt die Aufnahme an (80). Obwohl die Rate der Radikalbildung in der Leber höher ist als die in der Lunge (4), ist die Leber weniger empfindlich gegen Paraquat als die Lunge (20,21,44).

1.1.4. Therapie der Paraquatvergiftung

Gegen eine Paraquatvergiftung gibt es bisher kein spezifisches Antidot (19). Die Prognose ist von der Plasmakonzentration abhängig und wird als schlecht eingeschätzt, wenn diese am ersten Tag 0,2 mg/ml übersteigt (7) oder wenn die Behandlung nicht innerhalb von 36 Stunden nach der Einnahme einsetzt (111). Nach einer Studie konnte eine gezielte Behandlung die Überlebenschance von 13 auf 73% (Dosis unter 50 ml) und von 0% auf 50% (Dosis über 50 ml) steigern (23). Als allgemein akzeptiert gelten folgende Maßnahmen:

1. Entfernen des Paraquat vom Magen-Darm Trakt durch Laxantien (19,111), Adsorbentien(111,121) und Magenspülung (19,46).
2. Entfernung des Paraquat aus dem Blut durch forcierte

Diurese (7,111), Hämoperfusion (23), Peritoneal- und Hämodialyse (besonders im Falle eines Nierenversagens) (9,90).

3. α-Tocopherol (50), Antibiotika und Glucocorticoide (9,46).
4. Immunosupressiva und zytostatische Agentien (Cyclophosphamide) um die Lungenfibrose zu hemmen. Antifibrotische Agentien wie Kalium aminobenzoal. Diese Maßnahmen sind nur bei früher Anwendung wirksam(111).

Eine strenge Überwachung des Paraquatspiegels im Plasma, Fäces und Urin ist nützlich. Paraquat wird mit verschiedenen Methoden (Chromatographie, Spektrometrie, Kolorimetrie) bestimmt (71,111). Die Behandlung mit Superoxiddismutase in Tierversuchen hat Teilerfolge erzielt (2) und wurde von einigen Autoren für die Behandlung beim Menschen empfohlen (29,50,90).
Bei der Behandlung der Paraquatvergiftung muß stets beachtet werden, daß eine Hyperoxie die Lungenschäden verstärkt (10,23,37,54,110,111). Eine Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks, wenn möglich, hat zumindest einen limitierten Schutz gegen die Lungenschäden (37).

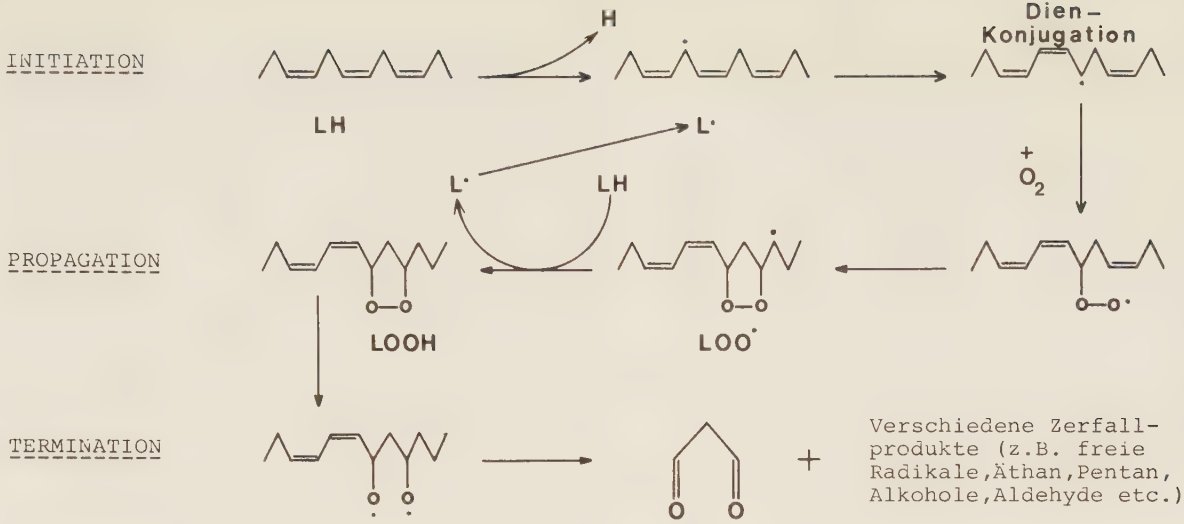
1.2. Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation wurde von Tappel definiert als "die Entartung von mehrfachungesättigten Lipiden als Folge oxidativer Reaktionen" (118). Obwohl die Peroxidation von Lipiden, als ein Phänomen verantwortlich für die Ranzigkeit von Fetten, schon vor vielen Jahren bekannt war, blieb ihre biologische Bedeutung zunächst auf die Lebensmitteltechnologie beschränkt. Erst in den letzten Jahren deuteten viele Hinweise darauf hin, daß diese Reaktionen auch in biologischen Systemen stattfinden, und daß sie für einige biologische und pathologische Vorgänge von Bedeutung sind (31).

1.2.1. Chemischer Verlauf der Lipidperoxidation (18,31)

Die Peroxidation von Lipiden ist eine radikalische Reaktion, die in einer Kettenreaktion mit drei Phasen verläuft (Abb. 3):

I. Initiation: Lipidperoxidation beginnt mit der homolytischen Spaltung einer C-H Bindung. Prädestiniert für eine solche Spaltung sind Methylgruppen zwischen 2 Doppelbindungen, wie sie in mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen vorkommen. Die Abstraktion eines H-Atoms wird durch Radikale oder Strahlung bewirkt. Sie führt in den Fettsäuren zur Entstehung eines Fettsäure-Radikals (L'), das sich durch Mesomeriestabilisierung zu konjugierten Doppelbindungen mit endständigem freien Elektron umlagert. Konjugierte Doppelbindungen zeigen eine charakteristische Absorption bei 230-240 nm, die zum Nachweis der Lipidperoxidation herangezogen wird.



$L^{\cdot} + L^{\cdot} \longrightarrow$ nicht radikales Produkt

$L^{\cdot} + LO_2^{\cdot} \longrightarrow$ nicht radikales Produkt

$LO_2^{\cdot} + LO_2^{\cdot} \longrightarrow$ nicht radikales Produkt

Abb. 3 : Verlauf der Lipidperoxidation.[Modifiziert nach (18) und (31)]
[LH: mehrfachungesättigte Fettsäure,L·:Lipidradikal,LOO·:Lipidperoxyradikal,
LOOH:Lipidhydroperoxid]

II. Propagation: Das Lipidradikal reagiert mit einem O_2-Molekül. Es entsteht ein Lipidperoxyradikal ($LOO^{\cdot}$), das von einem neuen Fettsäuremolekül ein H-Atom abstrahiert. Dabei entsteht ein Lipidhydroperoxid (LOOH) und ein neues Lipidradikal, das die Reaktionskette unterhält. Dieser Schritt ist autokatalytisch und sorgt für erneute Produktion von Lipidradikalen.

III. Termination: Die Reaktionskette wird beendet durch Reaktion der Lipidhydroperoxide, Lipidradikale und Lipidperoxyradikale miteinander oder durch vollständigen Zerfall der Lipidhydroperoxide. Dabei werden verschiedene Zerfallsprodukte gebildet, z.B. Malondialdehyd, Äthan, Pentan, Aldehyde und andere Bruchstücke der Moleküle.

1.2.2. Lipidperoxidation in biologischen Systemen

Die Lipidperoxidation entsteht in biologischen Systemen meistens an Membranlipiden und Phospholipiden, die zum großen Teil aus mehrfachungesättigten Fettsäuren bestehen (18). Die Stimulierung der Lipidperoxidation durch NADPH in Lebermikrosomen wurde nachgewiesen (86,91) und beruht wahrscheinlich auf der Fähigkeit von NADPH, Fe^{3+} zu reduzieren. Diese Reaktion wird von der mikrosomalen Cytochrom P_{450}-Reduktase katalysiert. Dadurch wird Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert, das die Lipidperoxidation initiiert. Die Kettenreaktion kann aber auch durch Einwirkung von Bestrahlung (125), chaotrope Agentien (z.B. NO_3^-, Br^-, J^-, CLO_4^-, SCN^-, Guanidin-HCl und Harnstoff) (53), zahlreiche Xenobiotika (z.B. CCl_4, Äthanol (32), Ozon, Stickstoffdioxide (18)) oder reaktive Sauerstoffradikale (siehe 1.3.) eingeleitet werden. Metallionen, vor allem Fe^{2+}, katalysieren die Reaktionskette (18).

1.2.3. Folgen und biologische Bedeutung der Lipidperoxidation

Als Folge von Lipidperoxidation treten Membranschäden auf, die die Integrität der Membranen (5) und damit u.a. die Aktivität der membrangebundenen Enzyme (31) beeinträchtigen. Die Lipidradikale können von den benachbarten Proteinen ein H-Atom abstrahieren, was zu intermolekularen Lipid-Protein oder Protein-Protein Bindungen führt (18). Ein Beispiel für lipidperoxidationsbedingte Membranschäden ist die Hämolyse von Erythrozyten bei Vit. E Mangeltieren nach Behandlung mit Dialursäure (18). Außerdem sind die Zerfallsprodukte der geschädigten Lipide, vor allem Malondialdehyd und Lipidhydroperoxide, zelltoxisch.

Experimentelle Befunde zeigen Hemmung der Proteinsynthese, Nucleotid- und Proteinschäden, Störung der DNS-Funktion, sowie kancerogene und mutagene Effekte (31). Lipidperoxidation dürfte mit zahlreichen biologischen und pathologischen Phänomenen in Zusammenhang stehen. Dazu gehören z.B. Biosynthese von Prostaglandinen (31,34), Alterungsprozesse, Tumoren, Atherosklerose, Entzündungsprozesse, Leberschäden (5), Toxizität von zahlreichen Agentien (z.B. Sauerstoff, Äthanol, CCl_4, Streptonigrin) (18), Antioxidansmangel (z.B. Vit.E und Selen) und Strahlenschäden (118).

1.2.4. Schutzmechanismen gegen Lipidperoxidation

Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren einen wesentlichen Teil der biologischen Membran darstellen, verfügt der Organismus über verschiedene Schutzmechanismen, die solche Reaktionen verhindern oder zumindest unter Kontrolle hal-

ten. Die endogene O_2-Konzentration wird in den meisten Geweben so niedrig gehalten, daß die Peroxidation von Membranlipiden nicht begünstigt wird (18). Endogene Radikalfänger (z.B. Carotin und Carotinoide) (18) und das Enzym Superoxiddismutase (siehe 1.4.) sorgen für die Beseitigung von freien Radikalen. Die lipidlöslichen Antioxidantien, hauptsächlich Tocopherole, die in die Membran eingebaut sind, fungieren als Elektronenakzeptoren und verhindern so, daß freie Lipidradikale neue Fettsäuremoleküle oxidieren (117). Glutathion (GSH) und Ascorbinsäure sind die wichtigsten wasserlöslichen Antioxidantien (18). GSH ist Substrat der selenabhängigen GSH-Peroxidase, die Lipidhydroperoxide zu stabilen Lipidalkoholen (18) und H_2O_2 zu Wasser reduziert (75). Dabei entsteht Glutathiondisulfid (GSSG), das von der GSH-Reduktase wieder zu GSH reduziert wird. Die dazu benötigten Reduktionäquivalente werden in Form von NADPH von der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase geliefert. Die biologischen Membranen sind außerdem so konstruiert, daß die Initiation und Propagation von Kettenreaktionen nicht begünstigt oder zumindest unter Kontrolle gehalten wird (siehe 1.3.1.).

1.3. Aktivierung von freien Radikalen in biologischen Systemen

Aerobische Organismen können potentiell oxidativem Stress ausgesetzt sein. Einerseits durch endogene biologische Reaktionen, andererseits durch Reaktionen von exogenen Agentien (18). Wenn Ratten in 100%iger O_2-Atmosphäre gehalten werden, sterben sie innerhalb von 72 Stunden (26). Bei höherem O_2-Partialdruck tritt der Tod sehr rasch ein (76). Die Toxizität von Sauerstoff ist verbunden mit dessen Eigenschaft als Elektronenakzeptor reaktive O_2-Spezies zu

bilden (76). Ein O_2-Molekül kann bis zu 4 Elektronen aufnehmen. Bei der univalenten Reduktion von O_2 zu Wasser, wie es in biologischen Systemen geschieht, können nach folgendem Schema zwei Radikalspezies entstehen, das Superoxidradikal und das Hydroxylradikal (42):

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^{-\cdot} \xrightarrow{e^- + 2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^- + H^+} HO^{\cdot} \xrightarrow{e^- + H^+} H_2O$$

Während der letzten Jahre haben viele Untersuchungen gezeigt, daß die Entstehung von Sauerstoffradikalen, vor allem $O_2^{-\cdot}$, auch in vivo geschieht. Einige Beispiele dafür sind:

- Cytochrom P_{450}- System (48)
- Xanthinoxidase katalysierte Xanthinoxidation (89)
- Photosynthese und Melaninbildung (30)
- Autoxidation von Hydroquinonen, Leukoflavinen, Katecholaminen und Thiolen (42)
- im mitochondrialen Elektronentransportsystem (39,76)

Das Superoxidradikal, per se, ist jedoch nicht reaktiv genug und hat wenig toxische Wirkung. Seine Toxizität liegt vielmehr darin, daß dessen Anwesenheit zur Entstehung von anderen reaktiven Sauerstoffspezies führt (76). Bei der Reaktion von $O_2^{-\cdot}$ mit H_2O_2 (Haber-Weiss-Reaktion) entsteht das reaktive Hydroxylradikal ($HO^{\cdot}$). Metallionen oder Transferrin katalysieren diese Reaktion (76):

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \xrightarrow{Me^{2+}} O_2 + HO^- + HO^{\cdot}$$

Es wird weiter angenommen, daß der Sauerstoff, der bei der Haber-Weiss-Reaktion entsteht der hochreaktive Singulett-

Sauerstoff ist (1,62,63).
Die Entstehung von Superoxidradikalen kann auch durch Metabolisierung von verschiedenen exogen zugeführten Stoffen induziert werden. Die toxische Wirkung von Alloxan, Dialursäure, 6-Hydroxy-Dopamin, Streptonigrin und Paraquat soll auf der Bildung von $O_2^{-\cdot}$ beruhen (18).

Neben Sauerstoffradikalen fungieren auch andere Radikale als Initiatoren der Lipidperoxidation. So scheint die Toxizität von CCl_4 in der Bildung von Trichlormethylradikalen ($CCl_3^{\cdot}$) zu bestehen (18,24). Lipidradikale können durch Reaktion von Lipiden mit anderen Radikalen (18) oder durch energiereiche Strahlen (125) entstehen und die Kettenreaktion einleiten.

1.3.1. Kontrolle von Radikalreaktionen in biologischen Systemen (30)

Die meisten Enzymsysteme, die Radikale bilden, sind membrangebunden. Der schnelle Transport der Radikalzwischenstufen von einem Enzym zum nächsten verhindert das Eindringen in bimolekulare Lipidschichten der Membran. Die labilen Strukturen der Membranen, z.B. der Fettsäureanteil der Phospholipide, sind in der hydrophoben Mittelzone eingeordnet und räumlich von der hydrophilen Zone, dem Ort der Radikalbildung, entfernt. Da die Radikale meist polar sind, können sie schwer in die apolare Mittelzone eindringen. Die chemische Heterogenität und die Subunitstruktur der Membranen tragen dazu bei, die Ausbreitung von Kettenreaktionen zu behindern. Die lipidlöslichen Antioxidantien und Radikalfänger verhindern einen Angriff von Radikalen bzw. die Ausbreitung der Kettenreaktionen. Die Anwesenheit eines spezifischen Enzyms, der Superoxiddismutase, trägt

dazu bei, Superoxidradikale schnell zu beseitigen, ehe die aktiveren Spezies ($^1O_2$, $HO^\cdot$) entstehen können (siehe 1.4.). Die GSH-Peroxidase und die Katalase beseitigen das Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

1.4. Superoxiddismutasen

Mit der Entdeckung der enzymatischen Dismutierung des Superoxidradikals im Jahr 1969 durch McCord und Fridovich wurde auch die biologische Funktion von zahlreichen Metallproteinen (z.B. Erythrocuprein, Hepatocuprein, Cerebrocuprein etc.) verstanden. Diese Proteine wurden aus verschiedenen Geweben isoliert (76). Intensive Studien haben gezeigt, daß diese Cupreine als Enzym in jeder aeroben Zelle einschließlich der fakultativ aeroben und sauerstofftoleranten Bakterien vorhanden sind. Die streng anaeroben Bakterien enthalten hingegen dieses Enzym nicht. Vielleicht kann so deren Empfindlichkeit gegen Sauerstoff erklärt werden (41). Zahlreiche Experimente haben in den letzten Jahren einen direkten Zusammenhang zwischen der Sauerstofftoxizität und der Aktivität von Superoxiddismutase nachweisen können. Dabei wurde die Vermutung bestätigt, daß Superoxidradikale während des aeroben Soffwechsels entstehen. Ein spezifischer endogener Schutzmechanismus scheint somit lebensnotwendig zu sein (27,76).

Bisher sind 4 Superoxiddismutasen bekannt. Sie haben alle die Eigenschaft, Superoxidradikale schnell zu dismutieren. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt $1{,}3 \times 10^9\ M^{-1}sec^{-1}$ für das Cu,Zn-Enzym (11,12). Bei der enzymatischen Dismutierung von $O_2^{-\cdot}$ ist das Metallion wesentlich beteiligt (42):

$$\text{Enz. } Me^{n+} + O_2^{-\cdot} \longrightarrow \text{Enz. } Me^{(n-1)+} + O_2$$

$$\text{Enz. } Me^{(n-1)+} + O_2^{-\cdot} \xrightarrow{+\ 2H^+} \text{Enz. } Me^{n+} + H_2O_2$$

$$2\ O_2^{-\cdot} \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

(Enz. = Enzym; Me = Metallseite)

Die prokaryotischen Organismen besitzen eine Eisen- und eine Mangan-haltige Superoxiddismutase, während die Eukaryoten eine Kupfer-Zink (Cytoplasma) und eine Mangan- (Mitochondrien) Superoxiddismutase besitzen (42).

1.4.1. Superoxiddismutase-aktive Verbindungen (11,12)

Freies Kupfer (Cu^{2+}) hat im sauren Milieu eine SOD-Aktivität, die die Aktivität des nativen Enzyms noch übertrifft. Diese Aktivität geht jedoch in Anwesenheit von Chelatbildnern, wie z.B. Serumalbumin, verloren. Einige niedermolekulare Kupferchelate von Aminosäuren, Di- und Tripeptiden wurden auf ihre SOD-Aktivität untersucht [$Cu(Tyr)_2$, $Cu(Lys)_2$, $Cu(Gly\text{-}His)_2$, $Cu(Gly\text{-}His\text{-}Leu)_2$]. Dabei wurde festgestellt, daß diese Komplexe eine SOD-Aktivität auch in Gegenwart von Serumalbumin zeigen. $Cu(Tyr)_2$ hatte die höchste Aktivität, die mit der des nativen Enzyms fast identisch war ($k = 1{,}0 \times 10^9\ M^{-1}sec^{-1}$). Ein stärkerer Komplexbildner, wie EDTA, konnte diese Aktivität jedoch vollständig hemmen.

1.5. Problemstellung

Obwohl die Superoxid-induzierte Lipidperoxidation als Wirkungsmechanismus der Paraquattoxizität weitgehend angenommen wurde,gibt es bisher zahlreiche Wiedersprüche, die weiterer Untersuchungen bedürfen. Die Teilerfolge bzw. Mißerfolge, einen Schutzeffekt mit SOD bei den experimentellen und therapeutischen Behandlungen der Paraquatvergiftung nachzuweisen, (2,29), könnten darauf zurückzuführen sein, daß das Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 32 000 oder mehr (41), nicht in die Zelle gelangen kann (89). Das niedermolekulare $Cu(tyr)_2$ hat auch in Anwesenheit von natürlichen Chelatbildnern eine dem nativen Enzym vergleichbare SOD-Aktivität. Es war zu erwarten,daß $Cu(tyr)_2$ aufgrund seines niedrigen Molekulargewichts und seiner hydrophoben Eigenschaften besser in die Zellen und Membranen eindringen kann (89). Es sollte geprüft werden, ob $Cu(tyr)_2$ einen Einfluß auf die Paraquattoxizität zeigt und somit eine Beteiligung von $O_2^{-\cdot}$ im Mechanismus der Paraquatwirkung nachzuweisen ist. Durch diese Untersuchungen sollten Hinweise zum besseren Verständnis der Paraquattoxizität gewonnen werden.
Als Versuchsmodell diente die isoliert perfundierte Rattenleber, das besser mit in vivo Verhältnissen vergleichbar ist als z.B. Hepatozyten oder isolierte Mikrosomen und Mitochondrien (siehe 2.2.).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Reagentien und Tiermaterial

R e a g e n t i e n

1. Äther zur Narkose, Hoechst
2. Albumin, bovine 96-99%, Sigma
3. Ammoniaklösung, 25%, Merck
4. n-Butanol, Merck
5. Chloroform, zur Bestimmung mit Dithizon, Merck
6. 1,2 Dichloräthan, Merck
7. Dünnschichtchromatographie Fertigplatten, Kieselgel 60 0,25 mm, Merck
8. Essigsäure 96%, Dichte 1,06, Merck
9. Glutathion Reduktase E.C.1.6.4.2., Sigma
10. Hydroxymethylaminomethan (Tris), Merck
11. Methanol, Fe- und H_2O- frei, Merck
12. Methyl Viologen (Parquat, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichlorid), Sigma
13. Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat, reduziert, (NADPH), Sigma
14. Perchlorsäure 60%, Dichte 1,53, Merck
15. Perhydrol (H_2O_2) 30%, Merck
16. Pyridin, Merck
17. Saccharose, reinst, Merck
18. Schwefelsäure 95-98%, Merck
19. SDS(Sodium dodecyl sulfat), Merck-Schuchardt
20. 1,1,3,3-tetramethoxypropan purum, Fluka AG
21. 2-Thiobarbitursäure, Sigma
22. Triäthanolaminhydrochlorid (TRA), Merck
23. Trichloressigsäure, Merck

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle weiteren Reagentien von "pro Analyse" Qualität verwendet.

$Cu(Tyr)_2$ wurde zur Verfügung gestellt. Es wurde wie in (12) angegeben hergestellt.

T i e r m a t e r i a l

Die Versuche wurden an männlichen, drei Monate alten Wistar-Ratten aus der institutseigenen Zucht mit einem Körpergewicht von 230 ± 20 Gramm durchgeführt. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen bei Zimmertemperatur, pro Käfig 3-5 Ratten gehalten. Altromin^R Pressfutter (Altrogge Kraftfutter GmbH, Lage, Lippe) und Leitungswasser standen ad libitum zur Verfügung. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Futter entzogen.

2.2. Leberperfusion

2.2.1. E i n f ü h r u n g (78,97,119)

Die extracorporale Durchströmung der Organe hat sich seit Ende des 19. Jahrhunderts, als Claude Bernard 1885 seine erste Leberperfusion mit Leitungswasser beschrieb, als nützliches Instrument vieler Versuchs- und Forschungsdisziplinen durchgesetzt und wurde innerhalb der nachfogenden 60 Jahre von mehreren Forschern (u.a. von Frei, Jacobs, Trowell, Corey und Britton, Brauer, Miller) bis zur heutigen Form entwickelt. Die Leberperfusion bietet gewisse Vorteile gegenüber anderen Versuchsmethoden, wie Gewebeschnitten, Gewebehomogenaten und isolierten Organellen, indem sie die volle Integrität der Organzellen und Zellkomponenten gewährleistet und Bedingungen bietet, die besser mit denen in vivo vergleichbar sind.
Die heutige Bezeichnung "Leberperfsuion" umfaßt jedoch viele Variationen in Operationstechnik, Perfusionsmedium, apparativer Ausrüstung und Perfusionsmethodik. Auf einige dieser Variationen wird im folgenden eingegangen.

I. Perfusionsmedium (103)

Das Perfusionsmedium wird am häufigsten von den einzelnen Autoren variiert, meistens ohne nähere Begründungen. Im wesentlichen werden die Perfusionsmedien in drei Gruppen eingeteilt:

1. Arteigenes Vollblut: meist mit Salzlösung verdünnt und mit gerinnungshemmenden Verbindungen, wie Heparin, versetzt. Es bietet die Vorteile, daß es den physiologischen Bedingungen angepaßt ist und große O_2-Aufnahmekapazität hat. Zu den Nachteilen zählen die Anwesenheit von

Hormonen und vasoaktiven Substanzen sowie die Notwendigkeit von vielen Spendertieren.

2. Halbsynthetische Perfusionsmedien: sie sind aus drei Grundkomponenten zusammengestellt, einem osmotisch wirksamen Anteil (Salzlösung), einem onkotisch wirksamen Anteil (hochmolekulare Verbindungen wie Dextran, Gelatine oder Albumin) und Erythrozyten (Mensch oder Rind) als Sauerstoffträger. Vorteil dieser Medien ist die hohe Sauerstoffaufnahme-Kapazität. Zu den Nachteilen zählen der eigene Stoffwechsel der Erythrozyten, der den Substratspiegel im Medium verändert, die Schwierigkeiten in Absorptionsmessungen (bedingt durch Hämoglobin) und meist eine progressive Hämolyse.

3. Erythrozytenfreie Salzlösungen: mit oder ohne onkotisch wirksamen Verbindungen. Diese Medien ermöglichen einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit, da alle Komponenten einfach und bekannt sind. Sie sind ökonomischer und einfacher herzustellen als die anderen Medien. Die geringe O_2-Aufnahmekapazität dieser Medien kann durch Erhöhung der Perfusionsrate überwunden werden.

II. Perfusionsmethodik (119)

In der Perfusionsmethodik lassen sich zwei Hauptvarianten unterscheiden:

1. Perfusion in einem geschlossenen rezirkulierenden System: in diesem System fließt das Medium durch einen Oxygenator zum Organ, wird anschließend gesammelt, zum Oxygenator zurückgeleitet und dem Organ in einem geschlossenen Kreislauf erneut zugeführt. Dieses System entspricht mehr der Situation in vivo und erfordert nur geringes Volumen von Medium (etwa 60-100 ml).

2. Perfusion im offenen System: in diesem System fließt das Medium nur einmal durch das Organ, wobei ein großes Volumen an Medium notwendig ist. Daher werden meist einfache Salzlösungen verwendet. Es hat den Vorteil, daß durch das Organ stets Medium konstanter Zusammensetzung fließt.

III. Vitalitätskontrolle (119)

Die Vitalität des perfundierten Organs kann während der Perfusion kontroliert werden. Das Aussehen des Organs, die Durchflußrate, das Membranpotential, der pH-Wert des Mediums, der Sauerstoffverbrauch und der Gallefluß (in Leberperfusionen) werden u.a. als Parameter für die Vitalität überprüft.

2.2.2. Perfusionssystem der vorliegenden Arbeit

Zu der vorliegenden Arbeit wurde ein offenes System, im wesentlichen nach Scholz (104) verwendet. Das Perfusionsgerät wurde in der institutseigenen Werkstatt angefertigt und bestand aus einem Membranoxygenator, einer elektrischen Rollenpumpe, einem Mediumreservoir und einem Perfusionstisch.

Der Oxygenator bestand aus einem gelochten hohlen Metallzylinder ummantelt mit einem Plexiglaszylinder. Um den Metallzylinder war ein 12 Meter langer Schlauch (Silikonkautschukschlauch, 0,2 mm Wandstärke und 2mm Innendurchmesser der Firma Detekta, Hamburg) gewickelt, der das Medium durch den Oxygenator förderte. Der Metallzylinder war durch einen isolierten Kreislauf temperiert.

Die Begasung erfolgte durch einfache Diffusion des Gasgemisches (95% O_2 + 5% CO_2, Carbogen) durch die Poren der Zylinderbasis in den Schlauch.

Eine elektrische Rollenpumpe verband das Mediumreservoir mit dem Oxygenator mittels eines Polyäthylenschlauchs (Braun-Melsungen). Die Durchflußrate konnte mittels auswechselbaren Zahnrädern von verschiedenen Größen gewählt werden.

Der Perfusionstisch bestand aus einem Plexiglasblock, der mit einer Führung für das Medium und je einer Bohrung für das Blasenfangsystem und die Sauerstoffmeßelektrode versehen war. Als Blasenfänger diente ein Filter aus feinmaschiger Seidengaze.

2.2.3. P e r f u s i o n s m e d i u m

Die Kontrollperfusionen wurden mit Krebs-Henseleit Salzlösung, der 0,1% Glucose zugesetzt war, durchgeführt. In den Versuchsperfusionen wurde nach 20 Minuten Perfusion mit Kontrollmedium das Versuchsmedium zugesetzt. Das Versuchsmedium bestand aus Kontrollmedium, dem $Cu(Tyr)_2$, Paraquat oder beide Stoffe gleichzeitig zugesetzt waren (siehe 2.7.).

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit Salzlösung (66):

NaCl	115	mmol/l
$NaHCO_3$	25	mmol/l
KCl	5,9	mmol/l
$MgCl_2.6H_2O$	1,18	mmol/l

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,24 mmol/l
Na_2SO_4	1,2 mmol/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,5 mmol/l

Der pH wurde auf 7,6 eingestellt.

2.2.4. Durchführung der Perfusion

Zur Durchführung der Perfusion und Operation wurde die Ratte mit Äther narkotisiert.

Operationstechnik

Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Speiseröhre cranial des Magens abgebunden. Um die Vena portae (zusammen mit der Arteria hepatica und dem Gallengang), sowie um die Vena cava caudalis (cranial der Einmündung der Vena renalis) wurde je eine Ligatur locker gelegt. Die Vena portae wurde mit laufendem Medium kanüliert, sodaß keine Luftblasen in die Leber gelangen konnten. Anschließend wurde die Vena cava caudalis caudal der vorbereiteten Ligatur angeschnitten, sodaß keine Stauung des Mediums in der Leber auftreten konnte. Die Kanüle der V. portae wurde ligiert, sodaß sie im Gefäß fixiert blieb und gleichzeitig die A. hepatica und der Gallengang abgebunden waren. (Gegebenenfalls wurde die Ligatur mit einer zweiten, etwas caudal dazu verstärkt).
Nun wurde die Brusthöhle eröffnet, und die V. cava cranialis wurde caudal der Herzbasis kanüliert und ligiert. Anschließend wurde die vorbereitete Ligatur um die V. cava caudalis abgebunden, sodaß das Medium ausschließlich aus der Kanüle der V. cava cranialis floß. Die Leber wurde vorsichtig freipräpariert und auf den Perfusionstisch gehängt. Die Durchflußrate wurde auf ca. 4-6 ml/Min pro g Leber gestellt.

2.2.5. Messung des Sauerstoffverbrauchs

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit einer Sauerstoffmesselektrode nach Clark, bezogen mit Cellophan und Teflon polarographisch gemessen. Das Medium war erythrozytenfrei. Somit war die arterio-venöse Differenz der O_2- Partialdrucke direkt proportional dem Sauerstoffverbrauch der Leber (104). Die Sauerstoffmessung wurde mittels eines Schreibers (Modell RE-511 Fa Servogor) über die ganze Perfusionsdauer aufgezeichnet, sodaß ein wichtiger Vitalitätsparameter der Leber ständig kontrolliert werden konnte.

2.3. Isolierung der Mitochondrien und Mikrosomen

Nach Aufschluß der Zellen durch mechanische Zerstörung des Zellverbandes (Homogenisation) wurden die Organellen durch Differentialzentrifugation aufgetrennt. Als Suspensionsmedium wurde eine Lösung von 0,25 mol/l Saccharose und 20 mmol/l TRA in bidest. Wasser verwendet. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Zum Waschen der Organellen wurde eine Lösung von 150 mmol/l Tris in bidest. Wasser (pH 7,4) verwendet.

Ausführung:
Die Leber wurde zerkleinert und in etwa 35 ml Medium suspendiert. Mit Hilfe eines Potter S-Homogenisators (B. Braun Melsungen) wurde die Suspension homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge, Modell J-21 B mit einem JA-20 Rotor) und das Sediment S1) bestehend aus Zellkernen und Debris, wurde gesammelt. Der Überstand Ü1 wurde für 10 Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert und das gewonnene Sediment (S2), bestehend aus Mitochondrien, mit Tris-Puffer zweimal gewaschen (für je 10 Minuten bei 12 000 x g).
Der Überstand (Ü2) wurde 20 Minuten bei 72 000 x g zentrifugiert und das gewonnene Sediment (S3) wurde verworfen während der Überstand (Ü3) für 60 Minuten bei 104 000 x g zentrfugiert wurde (Beckman L-2 Ultrazentrifuge mit SW 27 Rotor). Das letzte Sediment (S4), bestehend aus Mikrosomen wurde anschließend gewogen, und der Überstand (Ü4), bestehend aus Cytosol, wurde verwahrt.

Alle aufgeführten Prozeduren erfolgten in einer Kühlzelle bei einer Temperatur von 4°C.

2.4. Lipidanalyse

2.4.1. Lipidextraktion

Die Lipide wurden von Mitochondrien und Mikrosomen nach Folch (40) extrahiert. Alle Prozeduren mit den Lipiden erfolgten unter Stickstoffbegasung.

Lösungen:

Lösung 1: Methanol/Chloroform 3:1 (v/v)

Lösung 2: Methanol/Chloroform 1:2 (v/v)

Lösung 3: Methanol/Chloroform 1:1 (v/v)

Ausführung:

Die Mitochondrien bzw. Mikrosomen wurden in ca 15 ml von Lösung 1 für 3 Minuten bei 60° inkubiert, anschließend wurde die Suspension mit einem Ultraturrax^{R} (Fa IKA Werk) eine Minute zerkleinert und für 10 Minuten bei 18 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach kurzer N_2 - Begasung aufgehoben (verschlossen), während das Sediment in ca 10 ml von Lösung 2 für 3 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend für ca 30 Sekunden mit dem Ultraturrax zerkleinert wurde. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 18 000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde mit dem 1. Überstand vereinigt. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt und die gesammelten Überstände in einem Glaskolben unter N_2- Zufuhr bei 37°C im Vakuum eingedampft.

Die Lipide wurde danach in ca 5 ml von Lösung 3 aufgenommen und mehrmals durch eine G3 Fritte filtriert und wieder eingedampft. Anschließend wurden die so gereinigten Lipide gewogen, in 2 ml von Lösung 3 aufgelöst und in dunklen, gut verschließbaren Gläschen nach reichlicher N_2-Begasung bei einer Temperatur von ca -20°C aufbewahrt.

2.4.2. Auftrennung der Phospholipide

Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) wurden von den Gesamtlipiden mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 Fertigplatten aufgetrennt. Die Platten wurden vor der Verwendung bei 110°C für 6 Stunden erhitzt und anschließend in einer Atmosphäre von Petroläther/Methanol (84:16 v/v) aktiviert.

Unter Stickstoffatmosphäre wurden ca 5-10 mg der Gesamtlipide auf die Platte aufgetragen und getrocknet, anschließend wurden die Platten ca 2 Stunden chromatographiert. Das Fließmittel der ersten Dimension war Chloroform/Methanol/25% Ammoniak = 65/35/5 v/v. Nach Trocknen unter Stickstoff wurden die Platten für ca 75 Minuten in der zweiten Dimension entwickelt. Das Fließmittel war Chloroform/Methanol/Aceton/Eisessig/Wasser = 30/10/40/10/5 v/v.Nach Trocknen unter Stickstoff wurden die Phospholipide in einer Jodatmosphäre, durch Adsorption und Jodierung der ungesättigten Fettsäuren, markiert und identifiziert. Die Identifikation erfolgte durch Vergleich mit bekannten Phospholipiden.

Die identifizierten Flecken wurden aus den Platten mit einem Spatel vorsichtig ausgekratzt und die Phospholipide mit einer Lösung Methanol/Chloroform (1/1 v/v) aus dem Kieselgel extrahiert.

2.4.3. Darstellung der Fettsäure-methylester

Fettsäuremethylester wurden von PC, PE und einer Probe (3-5 mg) der Gesamtlipide durch Transmethylierung präpariert.
Die Proben wurden in Glasampullen unter N_2- Begasung getrocknet. Je Ampulle wurde 0,5 ml einer Lösung von $ZnCl_2$ in Methanol (1:25 w/v) zugefügt. Die Ampullen wurden nach N_2- Begasung zugeschmolzen und für 8 Stunden bei 110°C inkubiert. Nach Abkühlung wurden die Methylester durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie in 1,2-dichloräthan gereinigt. Die Ester waren als ölige Bande mit bloßem Auge gut erkennbar.

2.4.4. Gaschromatographische Analyse

Die Zusammensetzung der Fettsäuren der Lipide und Phospholipide wurde mit einem Gaschromatograph (Packard, Modell 7200/7300) analysiert. Das Gerät war mit einem Integrator (Waters, Modell 730) und einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgestattet.

Als Trennsäule diente eine 3 Meter lange Glassäule mit einem Innendurchmesser von 3 mm, gefüllt mit 5% Butandiol Succinat auf Chromosorb W (AW-DMCS), 100-120 mesh (Packard). Trägergas war Stickstoff (nachgereinigt). Die Durchflußrate betrug 25-30 ml/min. Als Flammengase dienten Wasserstoff (60 ml/min) und Pressluft (400 ml/min).
Die Temperatur im Einspritzblock und im Detektor betrug 260°C. Der Ofen der Trennsäule war auf einer Anfangstemperatur von 100°C und Endtemperatur von 225°C bei einer Erhitzungsrate von 5°C/min mit 25 minütiger Konstanz der Endtemperatur programmiert.

Die Peaks der einzelnen Fettsäuren wurden durch Vergleich der Retentionszeiten bekannter Standards identifiziert. Die Auswertung erfolgte automatisch vom Integrator durch Errechnen der Flächen der integrierten Peaks. Der Anteil jeder einzelnen Fettsäure wurde in % der gesamten Fettsäuren angegeben.

2.4.5. Dien - Konjugation

Prinzip:

Als Folge der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und der Mesomeriestabilisierung der Fettsäureradikale werden die isolierten Doppelbindungen zu konjugierten Doppelbindungen umgelagert, die eine charakteristische Absorption im UV-Bereich bei 230-240 nm aufweisen (siehe 1.2.1.).

Ausführung:

Eine Probe, ca 3-5 mg, der Lipide wurde sorgfältig unter Stickstoff getrocknet, gewogen und in 1 ml Methanol/ Chloroform (1:1 v/v) Lösung gelöst. Von dieser Lösung wurde ein Absorptionsspektrum von 210 - 300 nm aufgenommen. Hierzu wurde ein Aminco DW-2 Spektrophotometer benutzt. Das Spektrum wurde mit der split beam Methode gegen eine Methanol/Chloroform Lösung nach Basislinien Korrektur gefahren.

Aus dem Absorptionsspektrum wurde der Wert E_{235nm}/mg Lipid errechnet. Dieser Wert diente bei der Auswertung der Ergebnisse als Parameter für Lipidperoxidation.

2.4.6. Phosphatbestimmung

Der Phosphatgehalt der Gesamtlipide wurde nach Bartlett (6) mit Fiske-Subarrow Reagenz ermittelt. Zur Auswertung diente eine Eichkurve eines externen Phosphatstandards, von der der Phosphatgehalt der Lipide errechnet wurde.

2.5. Biochemische Bestimmungen

2.5.1. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Organellen wurde mit der Biuret Methode ermittelt (115).

Ausführung:

0,1 ml einer Suspension (von Mitochondrien, Mikrosomen oder Cytosol) wurde in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure gefällt. Nach kurzer Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Überstand

abpipettiert und dem Sediment wurden 0,2 ml bidest. Wasser und 0,5 ml Biuretreagenz zugesetzt. Die Mischung wurde so lange geschüttelt bis das Sediment vollständig aufgelöst war und anschließend die Extinktion E1 gegen Biuretreagenz bei 546 nm gemessen. Nach Zufügen von einer Spatelspitze KCN in die Küvette und aufwirbeln wurde die Extinktion E2 gemessen. Die Auswertung erfolgte nach der Beziehung:

E (Biuretwert) = E1 (Biuret+Suspensionswert) - E2 (Suspensionswert)

Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichkurve mit Rinderalbumin errechnet.

2.5.2. Malondialdehydbestimmung

Die Bestimmung des Malondialdehyds wurde mit Thiobarbitursäure nach Ohkawa et al. (87) durchgeführt.

Ausführung:

0,2 ml einer Suspension der Mitochondrien bzw. Mikrosomen oder Perfusat wurden in ein 15 cm langes Zentrifugenröhrchen pipettiert und 0,2 ml 8,1% SDS, 1,5 ml Eisessig (20%ig, pH mit NaOH auf 3,5 eingestellt) und 1,5 ml 0,8% Thiobarbitursäure zugefügt. Die Mischung wurde auf 4 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt und die Röhrchen mit Glasmurmeln bedeckt, in einem Wasserbad für 60 Minuten bei 95°C belassen. Nach Abkühlung wurde in jedes Röhrchen 1 ml bidest. Wasser und 5 ml einer Mischung von Pyridin/n-Butanol (1:15 v/v) zugefügt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Röhrchen für 10 Minuten bei 4000 Upm zentrfugiert. Von der organischen Phase wurde die Extinktion bei 532 nm gemessen.
Als Malondialdehydstandard diente eine 1,1,3,3-tetramethoxypropan Lösung (0,05 mmol/l).

2.5.3. Bestimmung des GSSG im Perfusat

Die Konzentration des GSSG im Perfusat wurde spektrophotometrisch ermittelt (108). 2 ml des Perfusats wurden alle 10 Minuten entnommen, mit 1 ml 0,6 n Perchlorsäure versetzt und kalt aufbewahrt. Am Ende der Perfusion wurden die entnommenen Proben mit KOH neutralisiert und je 0,5 ml Probe mit 0,2 ml einer Lösung von Triäthanolamin 0,1 mol/l, EDTA (1 mmol/l) und NADPH (50 µmol/l), pH 7,6 versetzt.

Die GSSG-Konzentration wurde aus der Extinktionsabnahme des NADPH nach Zugabe von GSH-Reduktase in einem Aminco DW-2 Spektrophotometer ermittelt.

Wegen des geringen GSSG-Gehaltes der Proben wurden die Messungen im 2 Wellenlängenverfahren bei 334-400 nm durchgeführt und unter Berücksichtigung der Verdünnungen auf µmol GSSG /h pro g Leber berechnet.

2.6. Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse

Als Variabilitätsmaß einer Meßergebnisreihe wurde die Standardabweichung gewählt (70).

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

In einigen Meßreihen (wird angegeben) wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes "S.E.M." gewählt (70).

$$S.E.M. = \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

Zum Vergleich zweier, von einander unabhängigen, Meßergebnisreihen wurde der "t-Test" nach Student (101) durchgeführt, eine Zufallswahrscheinlichkeit von $p < 0{,}05$ galt als signifikant.

2.7. Aufbau der Versuche

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei Abschnitten durchgeführt.

I. Untersuchungen über die Aufnahme von $Cu(Tyr)_2$, dessen Verteilung innerhalb der Zellen und Einfluß auf die Vitalität der isoliert perfundierten Leber. Dazu wurden Perfusionen mit verschiedenen Konzentrationen von $Cu(Tyr)_2$ durchgeführt. Die Vitalität der Leber wurde anhand des Sauerstoffverbrauchs und des Aussehens der Leber geprüft. Anschließend wurde die Leber fraktioniert und die Organellen (Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol) wurden mittels Atomabsorption+) auf ihren Gehalt an Kupfer untersucht.

II. Untersuchungen über den Einfluß von Paraquat auf die isoliert perfundierte Leber und den Effekt von $Cu(Tyr)_2$ als Superoxiddismutase aktive Substanz auf die Paraquat-induzierten Veränderungen. Zur Durchführung dieses Abschnittes wurden 4 Perfusionsreihen durchgeführt:

1. Kontrollperfusionen
2. Perfusionen mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium
3. Perfusionen mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium
4. Perfusionen mit 1 mmol/l PQ + 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium

In den Perfusionsreihen 2,3 und 4 wurde die Leber für 20 Minuten mit Kontrollmedium perfundiert und anschließend wurde das Versuchsmedium eingesetzt. Die Perfusionsdauer war in diesem Abschnitt einheitlich und betrug 180 Minuten. Die Konzentration des $Cu(Tyr)_2$ von 5×10^{-8} mol/l wurde in diesem Abschnitt gewählt, da bei dieser Konzentration die Vitalität der Leber nicht beeinträchtigt war (siehe Ergebnisse). Nach der Perfusion wurde die Leber fraktioniert und von Mitochondrien und Mikrosomen Lipide extrahiert.

Die zu untersuchenden Parameter waren:

1. Sauerstoffverbrauch
2. GSSG-Austritt in das Perfusat
3. Lipid- und Proteingehalt der Mitochondrien und Mikrosomen
4. Malondialdehydgehalt
5. Phospholipidgehalt der Lipide
6. Dien-Konjugation der Lipide von Mitochondrien und Mikrosomen
7. Fettsäurezusammensetzung der Gesamt- und Phospholipide aus Mitochondrien und Mikrosomen.

+) Die Atomabsorptionsuntersuchungen wurden dankenswerterweise von Frau Dr.rer.nat.Regina Brigelius (Inst. Pharmakologie, FB Tiermedizin) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Aufnahme von $Cu(Tyr)_2$

Zunächst wurde untersucht, ob $Cu(Tyr)_2$ von der Leber aufgenommen wird, und bei welcher Konzentration eine maximale Aufnahme erfolgt, ohne die Vitalität der Leber zu beeinträchtigen. Dazu wurden Perfusionsreihen mit 1×10^{-4}, 1×10^{-5} und 1×10^{6} Mol/l $Cu(Tyr)_2$ durchgeführt und Proben vom Perfusat alle 5 Minuten entnommen. Am Ende der Perfusionen wurde der Kupfergehalt der Proben sowie der der Ausgangsmedien mit Hilfe der Atomabsorption ermittelt. Da die Extinktion des Kupfers anhand einer Eichkurve der Konzentration proportional war, wurde der Aufnahmequotient nach folgender Beziehung errechnet:

$$\text{Aufnahmequotient} = 100 - \left(\frac{\text{E. Medium} - \text{E. Perfusat}}{\text{E. Medium}} \times 100 \right)$$

Abb. 4 zeigt den Aufnahmequotienten bei den untersuchten Perfusionen. In Versuchen mit 1×10^{-4} Mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium betrug der maximale Aufnahmequotient etwa 50%, die Vitalität der Leber war jedoch stark beeinträchtigt, was aus der fast vollständigen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs deutlich sichtbar war (siehe 3.3.). In den Versuchen mit 1×10^{-5} Mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium war der Quotient anfangs hoch (etwa 70%), nahm dann kontinuierlich ab und erreichte etwa 20% nach 30 Minuten Perfusion mit $Cu(Tyr)_2$. Ab diesem Zeitpunkt nahm der Aufnahmequotient wieder zu und erreichte etwa 50% bis zum Ende der Perfusion. In dieser Perfusionsreihe war der Sauerstoffverbrauch ebenfalls stark beeinträchtigt. Die Versuche mit 1×10^{-6} Mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium zeigten einen Aufnahmequotient von über 80% des angebotenen $Cu(Tyr)_2$. Der Sauerstoffverbrauch war in den ersten 60 Minuten nicht gehemmt, sodaß

diese Konzentration zumindest für kurzfristige Perfusionen geeignet war. Aus der Abb. 4 ist festzustellen, daß die Aufnahme von $Cu(Tyr)_2$ um so höher war, je niedriger die Konzentration im Perfusionsmedium war.
Die uneinheitlichen Perfusionszeiten waren in diesem Abschnitt durch die unterschiedliche Beeinflussung der Vitalität der Leber bedingt.

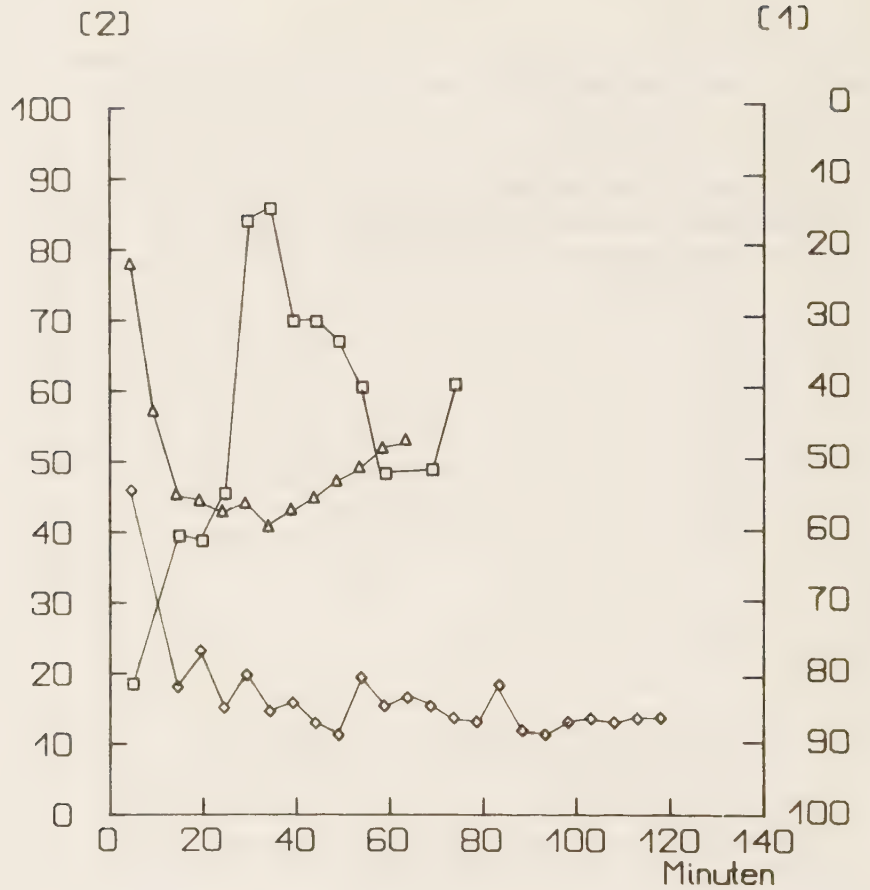


Abb. 4: Aufnahmequotient von $Cu(Tyr)_2$ bei verschiedenen Konzentrationen im Perfusionsmedium

Abszisse: Zeitverlauf nach Einsetzen von $Cu(Tyr)_2$ in Minuten

Ordinate: (1): Aufnahme [%]

(2): Prozentuales Verhältnis zwischen dem Ausgangsmedium und dem Perfusat

Versuche mit 1 x 10^{-4} Mol/l $Cu(Tyr)_2$

Versuche mit 1 x 10^{-5} Mol/l $Cu(Tyr)_2$

Versuche mit 1 x 10^{-6} Mol/l $Cu(Tyr)_2$

n = 2-3 je Meßpunkt

3.2. Verteilung von $Cu(Tyr)_2$ in den Leberzellkompartimenten

Zunächst wurde untersucht, wie sich $Cu(Tyr)_2$ innerhalb der Leberzellen verteilt. Die Leber wurde nach der Perfusion (3.1.) homogenisiert und fraktioniert. Die gewonnenen Fraktionen (Mitochondrien, Mikrosomen, Debris und Cytosol) wurden mittels Atomabsorption auf ihren Kupfergehalt untersucht. Tabelle 2 zeigt den Kupfergehalt der einzelnen Fraktionen bezogen auf den Proteingehalt in mg und den gesamten Kupfergehalt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurde $Cu(Tyr)_2$ proportional zur Konzentration im Perfusionsmedium aufgenommen. Die Mitochondrien und Mikrosomen nahmen, auch bei niedrigen Konzentrationen einen hohen Anteil des angebotenen $Cu(Tyr)_2$ auf (1,1 bzw. 4.39 nmol pro mg Protein).

Tabelle 3 zeigt das prozentuale Verhältnis von $Cu(Tyr)_2$ innerhalb der Zellfraktionen. In allen Perfusionsreihen wurde der größte Anteil von $Cu(Tyr)_2$ im Debris (Plasmamembranen und Zellkerne) gefunden. In den anderen Fraktionen war der Anteil von $Cu(Tyr)_2$ je nach der angebotenen Konzentration unterschiedlich.

Tabelle 2: Verteilung (1) und Gesamtaufnahme (2) von $Cu(Tyr)_2$ innerhalb der Leberzellen

		$1x10^{-6}$mol/l $Cu(Tyr)_2$	$1x10^{-5}$mol/l $Cu(Tyr)_2$	$1x10^{-4}$mol/l $Cu(Tyr)_2$
Mito-	(1)	1,1 ± 0.37	4,02 ± 0,44	61,89 ± 32,29
chondrien	(2)	0,019 ± 0,02	0,40 ± 0,04	5,3 ± 1,56
Mikro-	(1)	4,39 ± 3,25	14,97 ± 10,59	nicht gem.
somen	(2)	0,06 ± 0,03	0,23 ± 0,07	2,31 (n = 1)
Debris	(1)	1,32 ± 0,29	6,63 ± 0,84	87,74 ± 15,77
	(2)	0,75 ± 0,03	3,7 ± 0,58	113,57 ± 26,57
Cytosol	(1)	0,22 ± 0,19	2,83 ± 0,66	97,43 ± 27,12
	(2)	0,11 ± 0,09	1,27 ± 0,04	8,16 ± 1,31

(1) Die Werte sind angegeben in nmol/h pro mg Protein und berechnet als Mittelwerte ± S.E.M (n = 3)

(2) Die Werte sind angegeben in µmol/h und berechnet als Mittelwerte ± S.E.M (n = 3)

Tabelle 3: Verteilung von $Cu(Tyr)_2$ innerhalb der Leberzellen in Prozent

	$1x10^{-6}$mol/l $Cu(Tyr)_2$	$1x10^{-5}$mol/l $Cu(Tyr)_2$	$1x10^{-4}$mol/l $Cu(Tyr)_2$ (n =1)
Mitochondrien	17,4 ± 0,3	7,2 ± 0,6	3,0
Mikrosomen	5,7 ± 3,2	4,4 ± 1,8	18,7
Debris	68,0 ± 4,4	65,7 ± 4,4	70,6
Cytosol	8,9 ± 7,8	22,8 ± 2,7	7,7

Die Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. (n = 3)

3.3. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf den Sauerstoffverbrauch in der isoliert perfundierten Leber

Die Kurven in Abb. 5 zeigen den Sauerstoffverbrauch der Leber während der Perfusion. In den Kontrollperfusionen blieb der O_2-Verbrauch in den ersten 120 Minuten nahezu konstant und ging danach langsam zurück bis auf etwa 80% des Ausgangswertes am Ende der Perfusion (180 Minuten). Die Versuche mit 5 x 10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium zeigten eine leichte Zunahme des O_2-Verbrauchs (etwa 10% über den Ausgangswert), die über die ganze Perfusionsdauer (180 Minuten) konstant blieb.
In den Versuchen mit 1 x 10^{-6} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium stieg er in den ersten 60 Minuten leicht an (bis auf

etwa 15% über den Ausgangswert), ging dann kontinuierlich zurück und erreichte innerhalb von 120 Minuten etwa 80% des Ausgangswertes.
Höhere Konzentrationen von $Cu(Tyr)_2$ zeigten stärkere Hemmung des Sauerstoffverbrauchs. Dieser ging innerhalb von 70 Minuten in den Versuchen mit 1×10^{-5} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium auf etwa 70% des Ausgangswertes zurück.
In den Versuchen mit 1×10^{-4} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium war der Sauerstoffverbrauch innerhalb von 60 Minuten fast vollständig gehemmt (etwa 5% des Ausgangswertes).

Aus Abb. 5 ist festzustellen, daß die Konzentrationen 1×10^{-5} mol/l und 1×10^{-4} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium ungeeignet zur Leberperfusion waren, da bei diesen Konzentrationen die Vitalität der Leber stark beeinträchtigt war. Die Konzentration von 1×10^{-6} mol/l $Cu(Tyr)_2$ war nur begrenzt geeignet (für kurzfristige Perfusionen), da bei dieser Konzentration der Sauerstoffverbrauch bis zu 70 Minuten ungehemmt blieb. Die Konzentration 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium war für längere Perfusionen geeignet, da bei dieser Konzentration der Sauerstoffverbrauch nicht gehemmt war.

Wegen der unterschiedlichen Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs der Leber konnte in diesem Abschnitt (2.7.I) eine einheitliche Perfusionsdauer nicht eingehalten werden.

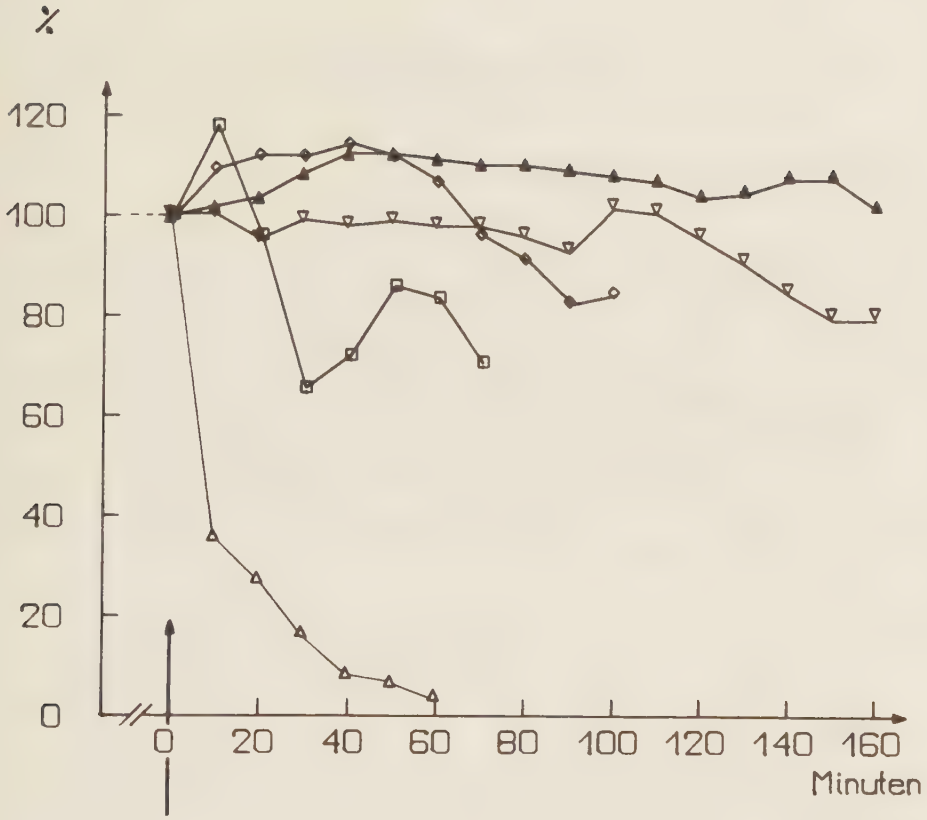


Abb. 5: Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf den O_2-Verbrauch der isoliert perfundierten Leber.

Abszisse: Zeitverlauf nach Einsetzen des $Cu(Tyr)_2$ in Min.

Ordinate: O_2-Verbrauch. Der Ausgangswert wurde gleich 100% gesetzt.

n = 2 - 3 je Meßpunkt

- Versuche mit Kontrollmedium
- Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$
- Versuche mit 1×10^{-6} mol/l $Cu(Tyr)_2$
- Versuche mit 1×10^{-5} mol/l $Cu(Tyr)_2$
- Versuche mit 1×10^{-4} mol/l $Cu(Tyr)_2$

3.4. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat-induzierten Veränderungen in der isoliert perfundierten Leber

3.4.1. Sauerstoffverbrauch

Abb. 6 und 7 zeigen den Sauerstoffverbrauch der Leber bei Perfusionen mit verschiedenen Perfusionsmedien (siehe 2.7. II). In den Kontrollperfusionen (Perfusionsmedium ohne Zusatz) blieb der O_2-Verbrauch in den ersten 120 Minuten weitgehend konstant und ging dann langsam bis auf 80% des Ausgangswertes am Ende der Perfusion zurück (180 Minuten). In den Versuchen mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium stieg er in den ersten 80 Minuten bis auf etwa 122% an, ging dann zurück und erreichte die Kontrollwerte gegen Ende der Perfusionsdauer.

Die Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium zeigten zwar auch eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches, jedoch um ca 10% weniger als die Versuche mit Paraquat.

Bei den Versuchen mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ + 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium wurde ebenfalls eine leichte Zunahme des Sauerstoffverbrauchs beobachtet. Der Kurvenverlauf dieser Versuche war höher als der der Kontrollperfusionen, sodaß eine Hemmung der Paraquat-induzierten Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch $Cu(Tyr)_2$ nicht verzeichnet werden konnte.

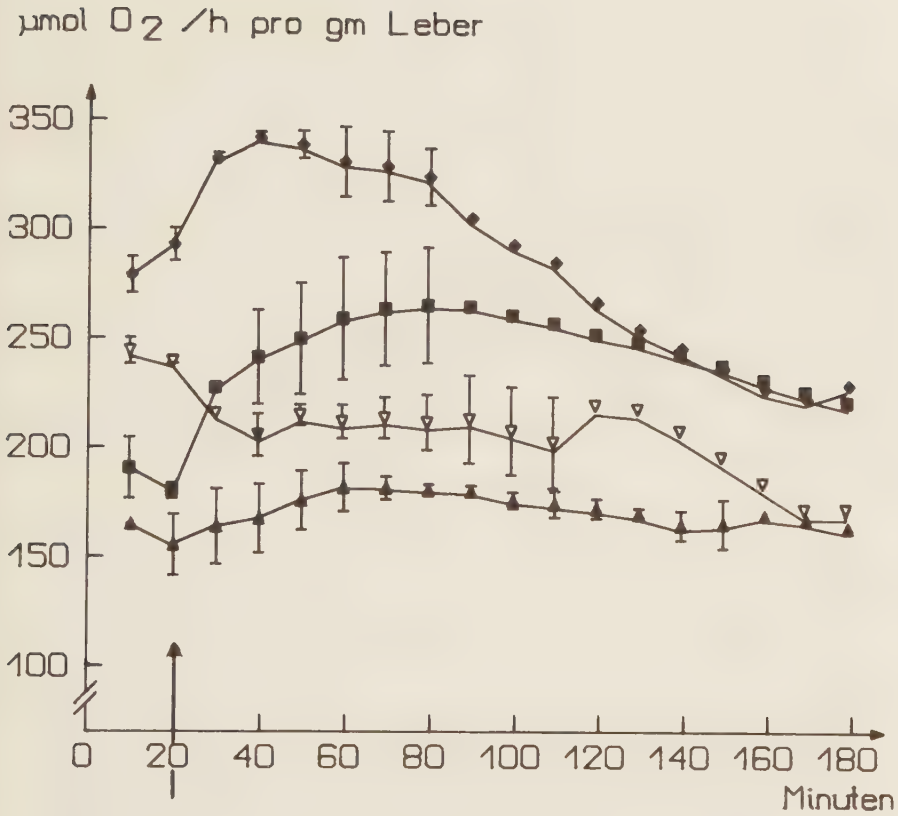


Abb. 6: Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat bedingte Veränderung im O_2-Verbrauch der isoliert perfundierten Leber

Abszisse: Perfusionszeit in Minuten

Ordinate: O_2-Verbrauch der Leber [µmol/h pro g Leber]
n = 2-3 je Meßpunkt

- Versuche mit Kontrollmedium
- Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Medium
- Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$
- Versuche mit 1mmol/l Paraquat + 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$

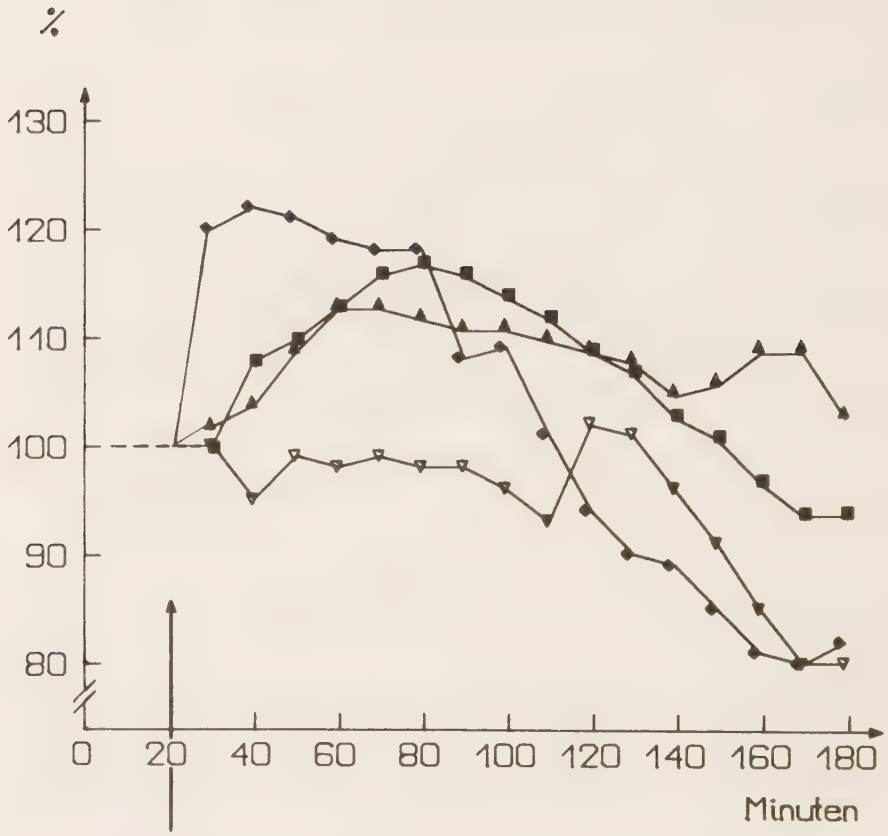


Abb. 7: Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat bedingte Veränderung im O_2-Verbrauch der isoliert perfundierten Leber

Abszisse: Perfusionszeit in Minuten

Ordinate: O_2-Verbrauch der Leber errechnet in % vom Ausgangswert, n = 2-3 je Meßpunkt

- Versuche mit Kontrollmedium
- Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Medium
- Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$
- Versuche mit 1 mmol/l Paraquat + 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$

4.3.2. Austritt von GSSG in das Perfusat

Bei diesen Versuchen sollte der Einfluß von Paraquat, als möglicher Initiator von Lipidperoxidation, auf das GSH-Peroxidase System und der Effekt von $Cu(Tyr)_2$ auf diesen Einfluß untersucht werden. Der Austritt von GSSG ins Perfusat sollte hier als Indikator für die GSH-Oxidation dienen. Proben vom Perfusat wurden während der Perfusion alle 10 Minuten entnommen. Die Proben wurden gleich nach der Entnahme mit 0,6 n Perchlorsäure angesäuert und kalt aufbewahrt, sodaß eine enzymatische Veränderung des GSSG-Gehaltes vermieden werden konnte. Nach der Perfusion wurden die Proben mit KOH wieder neutralisiert und auf ihren GSSG-Gehalt untersucht.

Die Abb.8 zeigt den GSSG-Efflux während der Perfusion. In den Kontrollperfusionen war der GSSG-Efflux gering und über die ganze Perfusionsdauer konstant. Die Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium zeigten hingegen eine deutliche und rasche Erhöhung des GSSG-Gehaltes des Perfusats (bis über 0,9 µmol/l pro Stunde und g Leber) in den ersten 70 Minuten der Perfusion. Danach ging der GSSG-Austritt etwas zurück (etwa 0,5 µmol/h pro g Leber) und blieb über die ganze Perfusionsdauer bei diesem Profil. Die Versuche mit 1 mmol/l Paraquat + 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium zeigten eine Teilhemmung des GSSG-Austrittes in der Anfangsphase (etwa 50% Hemmung in den ersten 70 Minuten), während eine Hemmung in der Endphase nicht verzeichnet werden konnte. Ab 70 Minuten war das GSSG-Profil in diesen Versuchen wie das in den Versuchen mit Paraquat allein. In den Versuchen mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium war das GSSG-Profil dem der Kontrollversuche vergleichbar.

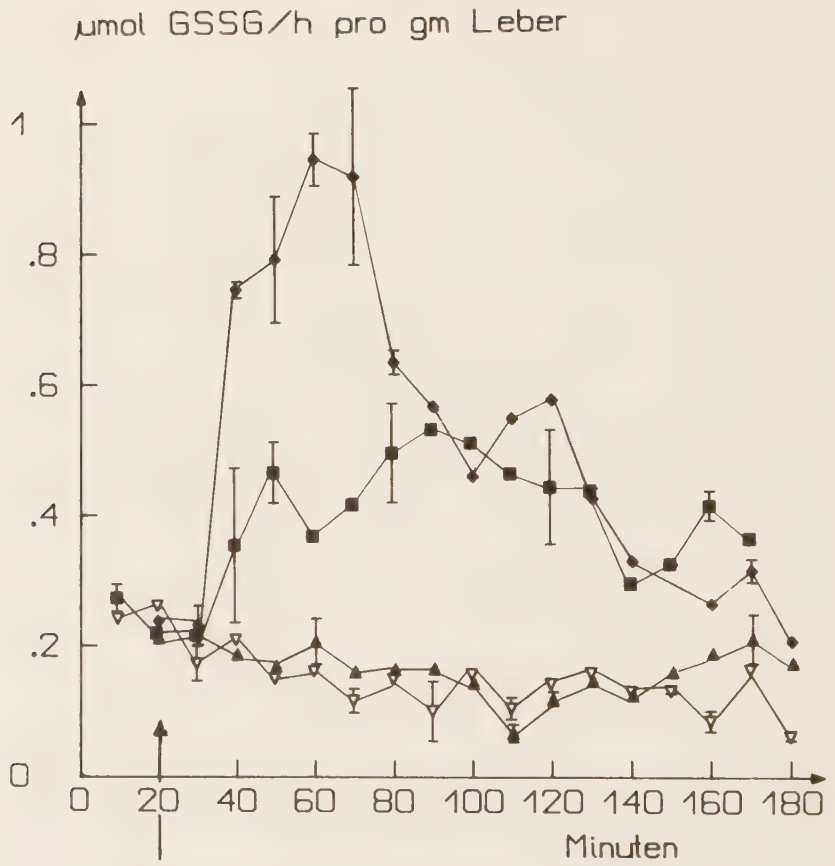


Abb. 8: Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat bedingte Veränderung der GSSG-Ausschüttung ins Perfusat

Abszisse: Perfusionszeit in Minuten

Ordinate: GSSG [µmol/h x g Leber] n = 2-3 je Meßpunkt

- Verusche mit Kontrollmedium
- Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Medium
- Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$
- Versuche mit 1 mmol/l Paraquat + 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$

3.4.3. Lipid- und Proteingehalt der Mitochondrien und Mikrosomen

Zunächst wurde der Einfluß von Paraquat auf den Lipid- und Proteingehalt der Mitochondrien und Mikrosomen, sowie die Wirkung von $Cu(Tyr)_2$ auf den Paraquat-Effekt untersucht. Nach den Perfusionen (siehe 2.7.II) wurden die Lebern homogenisiert und fraktioniert. Von den dabei gewonnenen Mitochondiren und Mikrosomen wurden aliquote Mengen für die Proteinbestimmung genommen und vom restlichen Anteil wurden die Gesamtlipide extrahiert.

Das Lipid/Protein Verhältnis wurde errechnet und ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium zeigten eine signifikante Senkung des Lipid/Protein Verhältnisses im Vergleich mit den Kontrollwerten, was auf einen Verlust von Lipiden hinweist.
In den Versuchen mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium konnte kein Einfluß auf den Lipid/Protein Quotienten beobachtet werden (die Werte waren nicht signifikant verschieden von den Kontrollwerten).
Die Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ + 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium zeigen, daß $Cu(Tyr)_2$ die Paraquat-induzierte Senkung des Lipid/Protein Quotienten aufheben konnte (signifikanter Unterschied im Vergleich mit den Paraquat-Werten).

Tabelle 4: Lipid/Protein Verhältnis in Mitochondrien und Mikrosomen der isoliert perfundierten Leber

	Kontrolle	5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$	1 mmol/l Paraquat	Paraquat + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondrien	0,34±0,05	0,35±0,07 n.s.	0,26±0,04 *	0,36±0,03 *
Mikrosomen	0,74±0,06	0,84±0,18 n.s.	0,42±0,14 **	0,70±0,07 *

Die Werte sind Mittelwerte ± s_x aus 3-5 Versuchen

Signifikanzangaben:

1. Bei Versuchen mit $Cu(Tyr)_2$- Medium: Signifikanz gegen die Kontrollwerte
2. Bei Versuchen mit Paraquat-Medium: Signifikanz gegen die Kontrollwerte
3. Bei Versuchen mit Paraquat + $Cu(Tyr)_2$: Signifikanz gegen die Paraquat-Werte

**: Signifikant mit $p < 0,01$

* : Signifikant mit $p < 0,05$

n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)

3.4.4. Dien-Konjugation der Lipide

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob Paraquat in den Lipiden eine Erhöhung der Absorption bei 235 nm (Kennzeichen für konjugierte Doppelbindungen, wie sie z.B. bei Lipidperoxidation entstehen) induziert, und ob $Cu(Tyr)_2$ eine solche Induktion beeinflussen kann.
Proben von extrahierten Lipiden (3.4.3.) wurden unter Stickstoff getrocknet, gewogen und in Methanol/Chloroform (1:1 v/v) aufgelöst, anschließend wurde die Absorption bei 235nm aus einem Absorptionsspektrum von 210-300 nm bestimmt und die Werte E/mg Lipid errechnet.

Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich, induzierte die Perfusion mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium eine Erhöhung der konjugierten Doppelbindungen in den mikrosomalen und mitochondrialen Lipiden (signifikanter Unterschied im Vergleich mit den Kontrollwerten).
Die Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium zeigten keine signifikante Veränderung der Dien-Konjugation gegen die Kontrollwerte.
Die Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ + 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium zeigten, daß $Cu(Tyr)_2$ die Paraquat-induzierte Erhöhung der konjugierten Doppelbindungen in den mitochondrialen Lipiden signifikant aufheben konnte. In den mikrosomalen Lipiden war der Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat-induzierte Erhöhung der konjugierten Doppelbindungen nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tabelle 5: Dien-Konjugation in mitochondrialen und mikrosomalen Lipiden [E_{235nm}/mg Lipid]

	Kontrolle	$5x10^{-8}$ mol/l $Cu(Tyr)_2$	1 mmol/l Paraquat	Paraquat + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondr.	0,238±0,012	0,228±0,027 n.s.	0,333±0,072 *	0,206±0,015 *
Mikrosomen	0,194±0,032	0,236±0,008 n.s.	0,296±0,007 **	0,214±0,046 n.s.

Die Werte sind Mittelwerte ± s_x aus 2-6 Versuchen

Signifikanzangaben:

1. Bei Versuchen mit $Cu(Tyr)_2$-Medium: Signifikanz gegen die Kontrollwerte
2. Bei Versuchen mit Paraquat-Medium: Signifikanz gegen die Kontrollwerte
3. Bei Versuchen mit Paraquat + $Cu(Tyr)_2$: Signifikanz gegen die Paraquat-Werte

**: Signifikant mit $p < 0,01$

* : Signifikant mit $p < 0,05$

n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)

3.4.5. Phosphatgehalt der Lipide

Der Einfluß von Paraquat auf die Phospholipide der Mitochondrien und Mikrosomen sollte untersucht werden. Für die quantitative Bestimmung der Phospholipide wurden die mitochondrialen und die mikrosomalen Gesamtlipide (3.4.3.) auf ihren Phosphatgehalt untersucht.

Wie aus der Tabelle 6 ersichtlich, zeigten die Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium eine signifikante Senkung des Phosphatgehaltes (Abnahme der Phospholipide) im Vergleich mit den Kontrollversuchen.
In den Versuchen mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ konnte kein Einfluß auf die Phospholipide beobachtet werden. Die Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ + 1 mmol/l Paraquat zeigten, daß $Cu(Tyr)_2$ die Paraquat bedingte Abnahme der Phospholipide sowohl in den Mitochondrien als auch in den Mikrosomen signifikant aufheben konnte.

Tabelle 6: Phospholipid-Phosphatgehalt der mitochondrialen und mikrosomalen Lipide [µmol/mg Lipid]

	Kontrolle	5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$	1 mmol/l Paraquat	Paraquat + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondr.	0,700±0.097	0,705±0,148 n.s.	0,550±0.039 *	0,663±0,087 *
Mikrosomen	0,824±0,058	0,836±0,157 n.s.	0,526±0,035 **	0,786±0,068 **

Die Werte sind Mittelwerte ± s_x aus 3-5 Versuchen.
Zur Signifikanzangabe siehe Legenden zu Tabelle 4 und 5

3.4.6. Malondialdehydbildung

Nach der Perfusion und anschließender Fraktionierung (siehe 3.4.3.) wurden die Mitochondrien und die Mikrosomen auf ihren Malondialdehydgehalt untersucht, der als Zerfallsprodukt der Fettsäuren bei der Lipidperoxidation entsteht. Wie aus der Tabelle 7 ersichtlich, ergab sich keine signifikante Veränderung in der Bildung von Malondialdehyd im Vergleich mit den Kontrollwerten weder nach der Perfusion mit Paraquat noch mit Paraquat + $Cu(Tyr)_2$. Proben vom Perfusat wurden auch auf ihren Malondialdehydgehalt untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnte Malondialdehyd im Perfusat nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Malondialdehydgehalt der Mitochondrien und Mikrosomen [nmol MDA/mg Protein]

	Kontrolle	5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$	1 mmol/l Paraquat	Paraquat + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondr.	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,5
Mikrosomen	1,7 ± 1,2	1,6 ± 0,9	1,4 ± 0,5	1,1 ± 0,1

Die Werte sind Mittelwerte ± s_x aus 2-4 Versuchen

Alle aufgeführten Werte stellen keine signifikanten Unterschiede gegen die Kontrollwerte dar ($p > 0,05$)

3.5. Einfluß von Paraquat und $Cu(Tyr)_2$ auf das Fettsäuremuster der Lipide und Phospholipide aus Mitochondrien und Mikrosomen

Diesen Versuchen ging die Überlegung voraus, daß die mehrfach ungesättigten Fettsäuren am meisten von einer Lipidperoxidation betroffen sind. Einen wichtigen Grund dafür stellen die isolierten Doppelbindungen dar, die eine besonders disponierte Struktur für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch Sauerstoffradikale darstellt. Als Folge der Lipidperoxidation werden Fettsäuren abgebaut, besonders ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Zu erwarten war eine Veränderung des Verhältnisses zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren.

Nach der Perfusion wurden Mitochondrien und Mikrosomen isoliert, die Lipide extrahiert und gereinigt. Die Lipide wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, und die gewonnenen Phospholipide, Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE), sowie eine Probe der Gesamtlipide transmethyliert und gaschromatographisch untersucht.

In den nachstehenden Tabellen (Tab. 8,9,10) sind die Fettsäuremuster der Gesamt- und Phospholipide der Mitochondrien und Mikrosomen zusammengestellt. Die Tabellen zeigen, daß die Fettsäuremuster, von geringen nicht signifikanten Veränderungen abgesehen, unverändert blieben. Diese Veränderungen waren deutlicher am Index[+)] und am Quotienten ungesättigt/gesättigt zu erkennen.

[+)] Die Summe der prozentual vorkommenden einzelnen Fettsäuren multipliziert mit der entsprechenden Anzahl von Doppelbindungen

3.5.1. Einfluß von Paraquat

Die Versuche mit 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium zeigten eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der ungesättigten und Zunahme der gesättigten Fettsäuren. Die Palmitinsäure (C 16) und die Stearinsäure (C 18) hatten eine zunehmende Tendenz, während die Ölsäure (C 18:1) und die Linolsäure (C 18:2) sowie die Arachidonsäure (C 20:4) eine sinkende Tendenz aufwiesen. Der Quotient ungesättigt/gesättigt und der Index waren, mit Ausnahme im Mitochondrien PE, niedriger als bei den Kontrollwerten (siehe Tabellen 8-10).
Da alle Änderungen nicht signifikant waren, konnte ein Verlust von ungesättigten Fettsäuren nicht nachgewiesen werden.

3.5.2. Einfluß von $Cu(tyr)_2$

Auch die Versuche mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(tyr)_2$ zeigten ein im wesentlichen ähnliches Fettsäuremuster wie das der Kontrollversuche mit Ausnahme von einigen,nicht signifikanten Veränderungen, z.B. Abnahme der Arachidonsäure im Mitochondrien PC und PE sowie Zunahme der Palmitinsäure im Mitochondrien und Mikrosomen PC (siehe Tabellen 8-10).

3.5.3. Einfluß von $Cu(tyr)_2$ auf die Paraquat-Wirkung

In den Versuchen mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(tyr)_2$ + 1 mmol/l Paraquat im Perfusionsmedium konnte $Cu(tyr)_2$, von einigen Ausnahmen abgesehen, die angedeuteten, durch Paraquat bewirkten Veränderungen aufheben. (Ausnahme: C 18:2 in den Mitochondrien Gesamtlipiden sowie C 18 und C 18:1 im Mitochondrien PE und Mikrosomen PC).
Da schon die Paraquat induzierten Veränderungen nicht signifikant waren, kann von einem Einfluß von $Cu(tyr)_2$ auf die Paraquat-Wirkung in diesen Versuchen nicht gesprochen werden.

Tabelle 8: Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktionen

Fettsäuren	Kontrollen	$Cu(Tyr)_2$	Paraquat	PQ + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondrien				
16	15,9 ± 0,58	16,0 ± 0,23	17,6 ± 0,74	16,2 ± 0,38
18	20,5 ± 0,42	21,4 ± 0,35	22,7 ± 0,13	20,9 ± 0,21
18:1	5,8 ± 0,22	5,6 ± 0,39	5,4 ± 0,20	6,3 ± 0,16
18:2	18,8 ± 1,06	17,0 ± 0,77	16,9 ± 0,95	16,7 ± 0,83
20:4	27,1 ± 0,82	28,3 ± 0,63	26,9 ± 0,59	27,7 ± 1,07
22:6	6,2 ± 0,28	6,0 ± 0,25	6,2 ± 0,32	5,9 ± 0,73
unges/ges	1,65 ± 0,08	1,58 ± 0,03	1,44 ± 0,04	1,59 ± 0,04
Index	200,8 ± 3,81	198,6 ± 1,62	194,0 ± 2,04	197,0 ± 3,39
Mikrosomen				
16	17,9 ± 0,43	17,0 ± 0,41	17,7 ± 0,47	16,9 ± 0,20
18	23,6 ± 0,50	24,1 ± 0,41	25,8 ± 0,80	23,2 ± 0,50
18:1	4,5 ± 0,13	4,4 ± 0,31	4,5 ± 0,11	4,6 ± 0,25
18:2	13,2 ± 0,61	12,8 ± 0,36	13,5 ± 0,55	13,1 ± 0,39
20:4	30,0 ± 0,73	30,6 ± 1,00	28,7 ± 0,51	30,4 ± 0,81
22:6	6,0 ± 0,27	5,4 ± 0,32	5,9 ± 0,47	6,0 ± 0,33
unges/ges	1,33 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,23 ± 0,02	1,37 ± 0,03
Index	195,9 ± 3,22	196,5 ± 3,17	189,5 ± 3,18	200,6 ± 3,30

Tabelle 9: Fettsäuremuster des Phosphatidylcholin

Fettsäuren	Kontrollen	$Cu(Tyr)_2$	Paraquat	PQ + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondrien				
16	19,8 ± 0,85	21,4 ± 0,45	23,1 ± 0,63	21,6 ± 0,67
18	21,6 ± 0,92	22,2 ± 1,10	21,0 ± 0,31	19,2 ± 0,17
18:1	5,2 ± 0,04	5,4 ± 0,36	5,1 ± 0,15	5,8 ± 0,24
18:2	13,3 ± 0,88	15,0 ± 0,33	14,5 ± 0,36	13,7 ± 0,83
20:4	30,4 ± 0,75	26,5 ± 0,84	27,4 ± 0,63	28,5 ± 0,61
22:6	4,4 ± 0,34	4,3 ± 0,26	4,4 ± 0,08	4,4 ± 0,51
unges/ges	1,28 ± 0,03	1,17 ± 0,06	1,16 ± 0,01	1,27 ± 0,05
Index	185,3 ± 3,50	172,4 ± 4,24	175,4 ± 1,97	181,0 ± 4,87
Mikrosomen				
16	19,7 ± 0,24	22,7 ± 0,38	23,9 ± 0,43	20,6 ± 0,68
18	24,5 ± 0,99	21,3 ± 0,51	21,8 ± 0,70	21,6 ± 0,24
18:1	4,3 ± 0,20	4,7 ± 0,51	4,7 ± 0,06	4,9 ± 0,18
18:2	12,8 ± 0,40	14,7 ± 0,64	14,4 ± 0,51	13,0 ± 0,48
20:4	30,3 ± 0,30	27,5 ± 0,41	27,7 ± 0,64	30,5 ± 0,57
22:6	4,4 ± 0,30	4,3 ± 0,27	4,6 ± 0,16	5,0 ± 0,48
unges/ges	1,32 ± 0,02	1,22 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,31 ± 0,03
Index	184,2 ± 3,16	180,2 ± 2,27	173,8 ± 2,06	189,0 ± 2,64

Tabelle 10: Fettsäuremuster des Phosphatidyläthanolamin

Fettsäuren	Kontrollen	$Cu(Tyr)_2$	Paraquat	PQ + $Cu(Tyr)_2$
Mitochondrien				
16	15,8 ± 0,43	15,5 ± 0,18	14,2 ± 0,68	14,7 ± 0,54
18	25,1 ± 0,39	24,4 ± 0,36	24,7 ± 1,15	23,4 ± 0,88
18:1	5,4 ± 0,23	5,4 ± 0,36	5,6 ± 0,30	6,0 ± 0,62
18:2	10,0 ± 0,42	11,8 ± 1,48	11,0 ± 0,05	9,2 ± 0,83
20:4	28,6 ± 0,66	28,2 ± 0,40	28,1 ± 0,51	30,1 ± 0,26
22:6	8,7 ± 0,29	8,2 ± 0,37	7,3 ± 0,05	8,2 ± 0,65
unges/ges	1,36 ± 0,03	1,52 ± 0,07	1,42 ± 0,02	1,45 ± 0,03
Index	206,6 ± 3,69	200,5 ± 3,57	211,8 ± 3,02	207,9 ± 4,23
Mikrosomen				
16	16,5 ± 0,62	16,0 ± 0,65	16,7 ± 0,26	15,2 ± 0,30
18	26,3 ± 0,16	25,7 ± 0,39	28,1 ± 0,40	24,5 ± 0,29
18:1	4,6 ± 0,21	4,4 ± 0,24	4,2 ± 0,11	5,3 ± 0,22
18:2	11,0 ± 1,08	11,1 ± 0,30	10,7 ± 0,17	11,1 ± 0,20
20:4	27,1 ± 0,82	28,8 ± 0,88	26,8 ± 0,47	28,2 ± 0,63
22:6	7,7 ± 0,20	8,4 ± 0,58	9,6 ± 0,17	9,6 ± 0,35
unges/ges	1,30 ± 0,04	1,32 ± 0,03	1,17 ± 0,02	1,38 ± 0.02
Index	203,3 ± 4,61	201,9 ± 4,91	198,2 ± 1,60	209,2 ± 2,04

4. DISKUSSION

4.1. Einfluß von Paraquat auf die isoliert perfundierte Leber

Bei Perfusion mit Paraquat konnten folgende Veränderungen im Stoffwechsel der Leber beobachtet werden.

4.1.1. Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch zeigte eine signifikante Zunahme am Anfang der Perfusion mit nachfolgender langsamer Abnahme. Er hat jedoch die Kontrollwerte innerhalb der gewählten Perfusionszeit (180 Minuten) nicht unterschritten.

Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch kann auf eine Lipidperoxidation hindeuten (117). Högberg et al. (56) beobachteten bei Lipidperoxidation in isolierten Hepatozyten eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs für kurze Zeit, gefolgt von einer Abnahme bis unterhalb die Kontrollwerte. Das gleiche berichteten auch Köster-Albrecht et al. (65) bei $CBrCl_3$ induzierter Lipidperoxidation in isolierten Hepatozyten.

Die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs kann aber auch durch eine erhöhte Aktivität des Pentosephosphatzyklus bedingt sein. Für die Reduktion von Paraquat werden Reduktionsäquivalente verbraucht (NADPH), die vom Pentosephosphatzyklus regeneriert werden (17). Eine solche erhöhte Aktivität ist möglich, da das Perfusionsmedium Glucose enthielt. Paraquat stimuliert die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase in der Lunge (16,120). Eine Erhöhung der Aktivität

der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase wurde auch in isolierten Leberperfusionen bei Vit. E Mangel gezeigt (85). O'Neil und Engelbrecht konnten in Lungenschnitten bei Inkubation mit Paraquat eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs mit nachfolgender Abnahme nachweisen (88). Das Inkubationsmedium enthielt auch hier Glucose. Bei Inkubation von Lungenschnitten in Medien ohne Glucose wurde die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs nicht beobachtet. Die Autoren schlossen daraus, daß die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs durch die Paraquat-induzierte Aktivierung des Pentosephosphatzyklus bedingt war.

4.1.2. GSH-Oxidation

Paraquat verursachte eine deutliche und rasche Oxidation des GSH. Das oxidierte Glutathion wird bei erhöhter Produktion aufgrund seiner guten Permeabilität von der Zelle in das Medium abgegeben (56). Die biologische Funktion des GSH als endogenes Antioxidant ist weitgehend akzeptiert. Es ist u.a. ein Substrat für die GSH-Peroxidase, die H_2O_2 und Lipidhydroperoxide zu H_2O bzw. Lipidalkoholen und H_2O reduziert (56,108).

$$2\ GSH + H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

$$2\ GSH + LOOH \longrightarrow LOH + GSSG + H_2O$$

Da während des Redoxzyklus von Paraquat $O_2^{-\cdot}$ entstehen sollte, das durch verschiedene Mechanismen eine Lipidperoxidation initiieren kann (siehe Einleitung) wäre die Entstehung von Lipidhydroperoxiden und ihre Reduktion durch das GSH-Peroxidase System eine Erklärung für den gesteigerten GSSG-Efflux nach Paraquat-Gabe. Das Perfusions-

medium enthielt keine schwefelhaltigen Aminosäuren wie Methionin oder Cystein, sodaß eine Neubildung von Glutathion nicht stattfinden konnte. Die Abnahme des GSSG im Perfusat nach 60 Minuten kann damit erklärt werden, daß der GSH-Gehalt der Leber erschöpft wurde. Eine solche Beobachtung wurde auch von Bus et al. gemacht (16).

Eine zweite Erklärung für den gesteigerten Efflux von GSSG wäre eine verminderte Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten. Die GSSG-Reduktase reduziert das im Laufe des Metabolismus entstehende GSSG mit Hilfe von NADPH wieder zu GSH. Paraquat wird auf Kosten von NADPH reduziert (15) und senkt den Gehalt an reduzierten Pyridinnucleotiden in der Lunge (126). Eine Steigerung der Produktion von NADPH im Pentosephosphatzyklus scheint hier trotz des Vorhandenseins von Glucose für die Reduktion von GSSG nicht ausreichend zu sein.

4.1.3. Lipid- und Phospholipidgehalt

Wie aus 3.4.3. ersichtlich, wurden signifikante Verluste in den Lipiden der Mitochondrien und Mikrosomen beobachtet. Eine Schädigung der Membranlipide kann diese Lipidverluste erklären (siehe Einleitung). Ebenso kann eine mögliche intermolekulare Lipid-Protein Verbindung die Ursache für diese Verluste sein. Nielsen (83,84) berichtete über eine kovealente Bindung zwischen peroxidiertem Cardiolipin und γ-Globulin oder Albumin, die 50% des Lipids nicht extrahierbar machte. Solche Bindung fand er nicht in Versuchen mit nicht peroxidiertem Cardiolipin, das völlig extrahierbar war.

Die Befunde in 3.4.5. zeigten eine signifikante Abnahme des Phosphatgehaltes der Lipide, das spricht für einen Verlust von Phospholipiden. Da die Phospholipide den größten Teil der Membranlipide darstellen, kann daraus geschlossen werden, daß die beobachteten Verluste der Lipide zum größten Teil den Membranphospholipiden zuzurechnen sind. Dieser Effekt von Paraquat wurde auch von anderen Autoren beschrieben. Fisher et al. (36), Fletcher und Wyatt (38) und Malmqvist et al. (72) haben über Verluste der Phospholipide, vor allem der Lecithine, in Lungen von mit Paraquat behandelten Ratten berichtet.

Die Verluste der Lipide bzw. Phospholipide können auf eine Lipidperoxidation hinweisen. Eine andere Erklärung safür ist die Paraquat bedingte Ausschöpfung des NADPH Pools (126), die die Synthese von Fettsäuren weitgehend beeinträchtigt (110).

4.1.4. Dien-Konjugation

Paraquat verursachte eine signifikante Zunahme der Dien-Konjugation. Die Erhöhung der konjugierten Doppelbindungen wird von vielen Autoren als sensitiver Indikator für eine Lipidperoxidation akzeptiert. May (74) berichtete über eine Korrelation der Dien-Konjugation mit der Kinetik der Lipidperoxidation. Recknagel und Ghoshal (94) beschrieben sie als die zuverlässigste Methode zum Nachweis einer Lipidperoxidation. Daraus ist zu schließen, daß nach Paraquat Gabe eine Lipidperoxidation stattfand.

4.1.5. Malondialdehyd

Wie aus 3.4.6. ersichtlich, hatte Paraquat keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von Malondialdehyd. In der Literatur zeigen die Experimente mit Paraquat hinsichtlich der Bildung von Malondialdehyd Wiedersprüche. Bus et al.(15)z.B. fanden eine MDA-Bildung bei der Inkubation von mikrosomalen Lipiden, isoliert aus der Lunge von Mäusen, bei Anwesenheit von NADPH, Paraquat und NADPH-Cyt.c Reduktase. Diese MDA-Bildung konnte durch Gabe von Superoxiddismutase in das Inkubationsmedium gehemmt werden (15).

Shu et al. (107) fanden zwar auch eine MDA-Bildung bei der Inkubation von Mokrosomen aus Lungengewebe von Mäusen mit Paraquat und NADPH, jedoch nicht bei der Inkubation von Mikrosomen aus der Rattenlunge, obwohl die Versuchsbedingungen vergleichbar waren. Auf der anderen Seite berichteten Ilett et al. (59), Steffen und Netter (113) sogar über eine Hemmung der MDA-Bildung in vitro durch Paraquat.

Für die hier vorliegenden Befunde können folgende Überlegungen in Frage kommen:

1. Malondialdehyd wird von den Mitochondrien metabolisiert (31,56,58,94). Högberg et al. berichteten, daß nach Hemmung der mitochondrialen Oxidation durch Chloralhydrat in isolierten Hepatozyten der MDA-Gehalt zunahm.Sie betrachteten diese Metabolisierung von Malondialdehyd als Schutzmechanismus gegen dessen Toxizität (57).

2. Die Bildung von Malondialdehyd wird in mild saurem Medium (pH 5,6) stimuliert während sie in mild alkalischem Medium (pH 7,4) gehemmt wird (31). In der vorliegenden Arbeit war der pH des Perfusionsmediums 7,6. Es ist also möglich,daß die MDA-Bildung in den vorliegenden Unter-

suchungen gehemmt wurde. Perfusion mit saurem Medium wurde als Alternative aus verschiedenen Gründen (z.B. Freisetzung von Hydrolasen und Phospholipasen) nicht durchgeführt.

3. Der Zerfall von Lipidhydroperoxiden zu Malondialdehyd erfolgt erst nach Erschöpfung der endogenen Antioxidantien, vor allem Vit.E und GSH (31). Dieser Zerfall ist von mehreren Faktoren abhängig, z.B. Anwesenheit von Metallionen,vor allem Fe^{3+},die ihn katalysieren (62).

4. Malondialdehyd ist ein kleines Molekül,das leicht in das Perfusat austreten könnte.Malondialdehyd konnte im Perfusat jedoch nicht nachgewiesen werden.Das kann damit erklärt werden,daß die Perfusionsmethodik der vorliegenden Arbeit den Nachweis von Malondialdehyd nicht begünstigte.Bei Perfusionen in einem offenen System,wobei ein großes Volumen von Medium verwendet wird (siehe 2.2.2.),könnte die Konzentration des ausgetretenen Malondialdehyds unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze der Meßmethode liegen.

5. Wie unter 4.1.2. diskutiert wurde,besteht die Funktion des GSH-Peroxidase Systems darin, Lipidhydroperoxide zu stabilen Lipidalkoholen zu reduzieren. Es liegt demnach nahe, daß kein Malondialdehyd entstehen konnte, zumindest nicht solange GSH verfügbar ist.

4.1.6. Fettsäuremuster der Lipide bzw. Phospholipide

Das Fettsäuremuster (3.5.1.) zeigte keine signifikanten Veränderungen als Folge der Perfusion mit Paraquat. Im allgemeinen wurde eine nicht signifikante Abnahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem Arachidonsäure (C 20:4), sowie eine Erniedrigung des Index und des Quotienten ungesättigt/gesättigt gefunden.Außerdem kam es zu einer Zunahme der gesättigten Fettsäuren (C16 und C18).

Diese Veränderungen waren jedoch alle nicht signifikant, sodaß keine besonderen Schlüsse aus diesem Befund gezogen werden können.

Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) stellen etwa 75% der Phospholipide der Mitochondrien und etwa 80% der Phospholipide der Mikrosomen dar (25). Untersuchungen dieser beiden Phospholipidklassen und der Gesamtlipide sollten demnach ein ausreichendes Bild über das ganze Fettsäuremuster der Membranlipide wiedergeben. Die Empfindlichkeit der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem C 20:4 und C 22:6, für oxidative Schädigungen wurde von vielen Autoren beschrieben (60,65,75,92,116). Die Abnahme der Arachidonsäure (C 20:4) wurde in anderen Arbeiten mit Paraquat nicht beobachtet (13,14), im Gegenteil es wurde eine Zunahme der C 20:4 und C 22:6 gemessen. Dieser Effekt wurde mit einem Mangel an Antioxidantien erklärt. Da in diesen Arbeiten das Perfusionsmedium keine Glucose enthielt, konnte der Mangel an GSH deutlichere Auswirkungen haben. In einer dieser Arbeiten (14) wurde die Abnahme des Quotienten ungesättigt/gesättigt auch beobachtet.

Aus den vorliegenden Befunden und der oben aufgeführten Diskussion kann geschlossen werden, daß bei den Paraquat-Perfusionen eine Lipidperoxidation initiiert wurde. Die rasche Oxidation des Glutathions und die nachfolgende verminderte Verfügbarkeit dieses wichtigen Antioxidans der Leber, ebenso wie die Paraquat-induzierte Senkung der reduzierten Pyridinnucleotide weisen auf eine Lipidperoxidation hin. Högberg et al. (55) und Högberg (58) berichteten, daß die Erschöpfung von GSH die Empfindlichkeit der isolierten Hepatozyten gegenüber einer Lipidperoxidation deutlich erhöht. Die verminderte Verfügbarkeit von reduzierten Pyridinnucleotiden kann auch eine Lipidperoxida-

tion begünstigen, denn die GSH-Reduktase ist NADPH abhängig . Bei verminderter Verfügbarkeit von NADPH wird die Reduktion von GSSG zu GSH beeinträchtigt, sodaß ein Mangel an Antioxidantien auftritt. Andererseits kann die verminderte Verfügbarkeit von reduzierten Pyridinnucleotiden zu einer Abnahme der Fettsäuresynthese führen. Es scheint nach den vorliegenden Befunden und den dargelegten Überlegungen wahrscheinlich, daß Paraquat die Lipidperoxidation nicht primär sondern sekundär, als Folge einer Erschöpfung von Glutathion und des NADPH-Pools ausgelöst hat.

4.2. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die isoliert perfundierte Leber

$Cu(Tyr)_2$ bietet ein effektives SOD-Modell, das eine dem nativen Enzym vergleichbare Aktivität zeigt (12) und ein relativ niedriges Molekulargewicht hat (MG = 425). Das Molekül ist schwach hydrophob (12,95) und kann aufgrund dieser Eigenschaften biologische Membranen permeieren.Es wurde als Superoxiddismutase Modell in membrangebundenen Systemen benutzt, an denen das native Enzym, wegen seiner Molekülgröße, keine Effekte zeigte (95).

4.2.1. Aufnahme und Verteilung

$Cu(Tyr)_2$ wurde umso mehr aufgenommen, je niedriger die Konzentration im Perfusionsmedium war. Eine Aufnahme in Mitochondrien und Mikrosomen ist nach den Kupferanalysen sehr wahrscheinlich (siehe 3.1. und 3.2.).

4.2.2. Sauerstoffverbrauch

Wie aus 3.3. ersichtlich, verminderte $Cu(Tyr)_2$ in hohen Konzentrationen den Sauerstoffverbrauch der Leber signifikant. In niedriger Konzentration (5×10^{-8} mol/l im Perfusionsmedium) wurde der Sauerstoffverbrauch nicht signifikant verändert. Superoxiddismutase wurde in anderen Untersuchungen an biologischen Systemen bereits in ähnlichen Konzentrationen angewendet. $7{,}2 \times 10^{-8}$ Mol SOD hemmten die GSH-induzierte Lipidperoxidation in isolierten inneren Mitochondrien Membranen (128). Michelson (77) berichtete über eine Aufhebung der $O_2^{-\cdot}$-induzierten Hemmung der Ribonuklease durch 4×10^{-8} Mol SOD. Außerdem zeigten Brigelius und Lengfelder (14), daß 3×10^{-8} mol/l Cu-Penicillamin (eine stabile Superoxiddismutase-aktive Kupferverbindung) Effekte auf die Paraquat-induzierten Veränderungen der isoliert perfundierten Rattenleber hatte.

4.2.3. Einfluß auf die untersuchten Parameter

Die Perfusion mit 5×10^{-8} mol/l $Cu(Tyr)_2$ im Perfusionsmedium zeigte keinen Effekt auf den GSH-Gehalt der Leber. Der GSSG-Austritt in das Perfusat blieb über die ganze Perfusionsdauer im Bereich der Kontrollwerte. Der Einfluß auf den Lipid- und Phospholipidgehalt war nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollwerten. Die Werte der Dien-Konjugation und der Bildung von Malondialdehyd wurden auch von $Cu(Tyr)_2$ nicht beeinflußt. Das Fettsäuremuster der Gesamt- und Phospholipide entsprach dem der Kontrollversuche.
Daraus kann geschlossen werden, daß $Cu(Tyr)_2$ in der gewählten Konzentration keine Eigenwirkung auf die Lipidperoxidation hatte.

4.3. Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat Wirkung

4.3.1. Sauerstoffverbrauch

Wie aus 3.4.1. ersichtlich, konnte $Cu(Tyr)_2$ die Paraquat-induzierte Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs im Anfang der Perfusion nicht signifikant aufheben. Der Kurvenverlauf verhielt sich wie der in den Versuchen mit $Cu(Tyr)_2$ allein. Daraus kann geschlossen werden, daß $Cu(Tyr)_2$ im Bezug auf den Sauerstoffverbrauch, die Wirkung von Paraquat nur zum Teil hemmte. Eine Erklärung für diese Teilhemmung wäre der oben beschriebene Effekt auf den Pentosephosphatzyklus. Eine andere Erklärung könnte sein, daß $Cu(Tyr)_2$ im Vergleich zur Kontrolle selbst einen nicht signifikant erhöhten Sauerstoffverbrauch verursacht.

4.3.2. GSH-Oxidation

$Cu(Tyr)_2$ konnte den Paraquat-induzierten Austritt von GSSG in das Perfusat zwar signifikant erniedrigen, jedoch nicht vollständig. Zur Interpretation dieser Beobachtungen können folgende Überlegungen angestellt werden:

1. $Cu(Tyr)_2$, als Superoxiddismutase wirksame Substanz, katalysiert die Dismutation von $O_2^{-\cdot}$ zu H_2O_2. In Versuchen mit Paraquat + $Cu(Tyr)_2$ wäre zu erwarten, daß mehr H_2O_2 entsteht als in Versuchen mit Paraquat allein. Daraus würde eine Zunahme von oxidiertem Glutathion im Perfusat folgen. Bei dieser Überlegung ist jedoch zu beachten, daß das GSH-Peroxidase System auch Lipidhydroperoxide reduziert, die durch Paraquat entstehen sollten und die bei Anwesenheit von $Cu(Tyr)_2$ nicht produziert werden. Das GSH-

Peroxidase System übernimmt also bei den Versuchen mit Paraquat + $Cu(Tyr)_2$ nur den Abbau von H_2O_2 und nicht von H_2O_2 plus Lipidhydroperoxide, wie es der Fall ist bei den Versuchen mit Paraquat allein. Bei dieser Überlegung wäre die Teilhemmung des GSSG Austritts durch $Cu(Tyr)_2$ wahrscheinlicher als eine völlige Hemmung.

2. Der Austritt von GSSG in das Perfusat ist keine direkte Folge der Lipidperoxidation, bzw. der Reaktion vom GSH-Peroxidase System auf eine erhöhte Produktion von Lipidhydroperoxiden, sondern vielleicht eine Folge der NADPH Erschöpfung, bedingt durch den Redoxzyklus von Paraquat. Gegen diese Überlegung sprechen zwei Argumente.
Erstens ist es wenig wahrscheinlich, daß der rasche Austritt von GSSG (10 Minuten nach Paraquat-Gabe) auf eine Erschöpfung von NADPH zurückzuführen ist, insbesondere in Anwesenheit von Glucose, die zusammen mit dem aktivierten Pentosephosphatzyklus für die Bereitstellung von reduzierten Reduktionsäquivalenten (NADPH) sorgt.
Zweitens wäre zu erwarten, daß $Cu(Tyr)_2$ dann keinen Effekt zeigt. $Cu(Tyr)_2$ sollte den Redoxzyklus von Paraquat nicht hemmen, sondern als zusätzliche Superoxiddismutase das entstandene $O_2^{-\cdot}$ dismutieren. Diese Überlegung käme dann in Frage, wenn $Cu(Tyr)_2$ einen anderen, SOD-unspezifischen Effekt auf Paraquat hat, etwa Bindung von Paraquat Molekülen. Paraquat kann Komplexe mit Metallsalzen bilden. Calderbank und Slade (22) berichteten, daß Paraquat dichlorid mit $CuCl_2$ einen Komplex [N,N' dimethyl-4,4'-bipyridylium tetrachlorocuprat, $(CH_3.NC_5H_4.C_5H_4N.CH_3)^{2+}$ $(CuCl_4)^{2-}$] bildet. $Cu(Tyr)_2$ könnte also durch Komplexbildung mit Paraquat die Konzentration an wirksamem unkomplexiertem Paraquat verringern und somit den NADPH-Verbrauch. $Cu(Tyr)_2$ ist möglicherweise in biologischen Systemen nicht stabil, sodaß das freiwerdende Cu^{2+} mit Paraquat einen Komplex bildet. Für diese Überlegung

spricht, daß Cu-Penicillamin, ein stabiles SOD-aktives Molekül mit höherem Molekulargewicht (MG ca 2 200) den Paraquat-induzierten Austritt von GSSG in das Perfusat gar nicht beeinflussen konnte (14).

3. McCay et al (75) vermuteten, das die biologische Funktion des GSH-Peroxidase Systems mehr in der Verhinderung des Initiationsschrittes der Lipidperoxidation besteht als in der Beseitigung der Lipidhydroperoxide. Sie berichteten, daß das GSH-Peroxidase System freie Radikale, darunter auch Hydroxylradikale, beseitigen kann. In einer Arbeit von May (74) wurde gezeigt, daß GSH eine Hemmung der Dien-Konjugation bewirkte. Diese Überlegung kann den raschen Austritt von GSSG in das Perfusat erklären, als Reaktion des GSH-Peroxidase Systems auf die von Paraquat induzierten Radikale. Die Teilhemmung durch $Cu(Tyr)_2$ kann damit erklärt werden, daß freie Radikale, durch die Dismutierung von $O_2^{-\cdot}$ nicht entstehen, sondern nur H_2O_2, das auch von der GSH-Peroxidase beseitigt wird.

4.3.3. Einfluß auf andere Paraquat Effekte

$Cu(Tyr)_2$ konnte die Paraquat-induzierte Erniedrigung des Lipid/Protein Quotienten der Mitochondrien und Mikrosomen und Erniedrigung des Phsophatgehaltes der mitochondrialen und mikrosomalen Lipide signifikant aufheben. Die Paraquat-induzierte Erhöhung der konjugierten Doppelbindungen wurde durch $Cu(Tyr)_2$ in den mitochondrialen Lipiden signifikant und in den mikrosomalen Lipiden nicht signifikant aufgehoben. Die Aufhebung dieser Paraquat-induzierten Effekte durch $Cu(Tyr)_2$ deutet darauf hin, daß sie durch Wirkung von Superoxidradikalen hervorgerufen wurden.

Der rasche Austritt von GSSG in das Perfusat und die vermutete Erhöhung der Aktivität des Pentosephosphatzyklus können jedoch zu der Annahme führen, daß diese Wirkung von Superoxidradikalen nicht primär erfolgt, sondern sekundär als Folge des Mangels an Antioxidantien (GSH) und der Erschöpfung des NADPH Pools, das für die Regenerierung von GSH durch die GSH-Reduktase notwendig ist. In einer Arbeit von Brigelius und Lengfelder (14) konnte das Superoxiddismutase aktive Cu-Penicillamin auch gleiche Wirkung auf diese Paraquat-induzierten Effekte zeigen.

Nach einer kritischen Wertung der vorliegenden Befunde kann geschlossen werden, daß Paraquat in der isoliert perfundierten Rattenleber eine Lipidperoxidation hervorruft, die jedoch nicht primär zu sein scheint. Es ist anzunehmen, daß aufgrund der Erschöpfung von endogenen Antioxidantien und Reduktionsäquivalenten die Lipidperoxidation ungehindert ablaufen kann. Der Effekt von $Cu(Tyr)_2$ auf die gemessene Lipidperoxidation läßt den Schluß zu, das diese durch Superoxidradikale initiiert wurde. Der Einfluß von $Cu(Tyr)_2$ auf die Paraquat-induzierten Veränderungen scheint aber nicht ausschließlich auf dessen SOD-Aktivität zu beruhen. Eine Komplexbildung mit Paraquat kann nicht ausgeschlossen werden.

4.4. Beurteilung der Anwendung von $Cu(Tyr)_2$ als Antidot bei Paraquat-Vergiftungen

Teilerfolge der Behandlung von experimentellen Paraquat-Vergiftungen mit SOD (2) weisen darauf hin, daß der Wirkungsmechanismus mit der Bildung von $O_2^{-\cdot}$ in Zusammenhang gebracht werden kann. Natürlich vorkommende SOD kann jedoch infolge der Molekülgröße nicht in die Zelle eindringen. Daraus folgt, daß nur extrazellulär entstehende $O_2^{-\cdot}$-Radikale dismutiert werden können. Niedermolekulare Kupferkomplexe vom Typ des $Cu(Tyr)_2$ mit SOD-Aktivität und der Eigenschaft Zellmembranen zu permeieren, können einen neuen Weg aufzeigen, therapeutisch in kausale Mechanismen einzugreifen, bei denen $O_2^{-\cdot}$ als initial toxisches Radikal entsteht. Dazu gehören u.a. Entzündungen, Schwermetallvergiftungen, Strahlenkrankheiten und bestimmte Herbizidvergiftungen. Ob $Cu(Tyr)_2$ für dieses Wirkprinzip geeignet ist, kann derzeit nicht beurteilt werden. Sicher scheint zumindest, daß die therapeutische Breite sehr klein ist. Zu prüfen bleibt auch die Eigentoxizität solcher Stoffe, insbesondere im Hinblick auf die Metabolisierung, Ausscheidung und auf elektronenübertragende Prozesse.

Inzwischen wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt, auch andere niedermolekulare Kupferkomplexe im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz zu prüfen. Ein Beispiel ist Cu-Penicillamin.Dieser Komplex mit SOD-Aktivität hemmt sowohl die phytotoxische Wirkung von Paraquat (127) als auch bestimmte durch Paraquat verursachte Veränderungen in der isoliert perfundierten Rattenleber (14). Es werden weitere Untersuchungen notwendig sein, bevor die Frage eines therapeutischen Einsatzes beantwortet werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß von $Cu(Tyr)_2$, einem Superoxiddismutase-aktiven Kupferkomplex, auf die Paraquat Wirkung in der isoliert perfundierten Rattenleber wurde untersucht. Die Perfusion mit Paraquat bewirkt eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs, erhöhten Austritt von GSSG in das Perfusat, Abnahme des Lipid/Protein Quotienten in den Mitochondrien und Mikrosomen sowie eine Erhöhung der Dien-Konjugation der mitochondrialen und mikrosomalen Lipide. Außerdem kommt es zu einer Abnahme des Phospholipidphosphatgehaltes und zu nicht signifikanten Veränderungen im Fettsäuremuster der Gesamt- und Phospholipide in Mitochondrien und Mikrosomen.

Diese Effekte konnte von $Cu(Tyr)_2$ aufgehoben werden, ausgenommen die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs und des GSSG-Austritts in das Perfusat. Diese Wirkungen konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen nur zum Teil gehemmt werden. Nach abschließender Diskussion wurde aus diesen Befunden geschlossen, daß die Wirkung von Paraquat an der isoliert perfundierten Rattenleber auf eine Erschöpfung der endogenen Antioxidatien (GSH) und der Reduktionsäquivalente (NADPH) beruht. Eine sekundär, $O_2^{-\cdot}$ bedingte Lipidperoxidation ist die Folgereaktion. Die SOD-Aktivität von $Cu(Tyr)_2$ sowie eine mögliche Komplexbildung mit Paraquat wurde als Ursache für die antagonisierende Wirkung angenommen.

6. SUMMARY

The influence of $Cu(tyr)_2$, a superoxiddismutase-active copper complex, on the paraquat action in the isolated perfused rat liver was studied. The perfusion with paraquat resulted in an increase of the oxygen consumption, accelerated release of GSSG into the perfusate, decrease in the lipid/protein ratio of the mitochondria and microsomes as well as increased diene conjugation of the mitochondrial and microsomal lipids. Moreover a decrease of the phospholipid content and an unsignificant alteration in the fatty acid distribution of the total and phospholipids was observed. Paraquat did not stimulate the formation of malondialdehyde. These effects could be reversed by $Cu(tyr)_2$ except for the increased oxygen consumption and the enhanced GSSG release. These latter effects could only partially be inhibited under the same experimental conditions. After a brief discussion, it was concluded from these results that the action of paraquat in the isolated perfused rat liver was based on the depletion of the endogenic antioxidant (GSH) and of the reducing equivalent (NADPH) with a secondary, $O_2^{-\cdot}$- mediated lipid peroxidation as a consequence. The SOD activity of $Cu(tyr)_2$ as well as a possible complex formation with paraquat were assumed to be the cause of this antagonistic action.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Auclair,C. und Lecomte,M.C. (1978)
Singlet oxygen production associated with hydroperoxide induced lipid peroxidation in liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 85, 946-951

2. Autor, A.P. (1974)
Reduction of paraquat toxicity by superoxide dismutase
Life Science 14, 1309-1319

3. Autor,A.P. und Schmitt,S.L. (1977)
Pulmonary fibrosis and paraquat toxicity in:
"Biochemical mechanisms of paraquat toxicity" Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York, S. 175-186

4. Baldwin,R.C., Pasi,A., Gregor,J.T. und Hine, H.C. (1975)
The rates of radical formation from the dipyridylium herbicides paraquat, diquat, and morfamquat in homogenates of rat lung, kidney and liver: An inhibitory effect of carbon monoxide.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 32, 298-304

5. Barber,A.A. und Bernheim,F. (1967)
Lipid peroxidation: its measurement, occurence and significance in animal tissues. in:
"Advances in Gerontological research", Hrsg. B.L. Strehler, Academic Press, New York, London. Vol. 2, S. 355 ff

6. Bartlett,G.R. (1959)
Phosphorous assay in column chromatography
J. Biol. Chem. 234, 466-468

7. Baselt, R.C. (1979)
Paraquat. In: "Disposition of toxic drugs and chemicals in man". Biomedical publications, Canton, Connecticut, Vol. 2, S. 234-237

8. Böger,P. und Kunert,K.J. (1978)
Phytotoxic action of paraquat on the photosynthetic apparatus.
Z. Naturforsch. 33c, 688-694

9. Bony,D., Favarel-Garrigues,J.C., Cledes,J., Cameilh,J. und Castaing,R. (1971)
Intoxication par le paraquat
Eur. J. Toxicol. 4, 406-411

10. Borchard,F., Grabensee,B., Jax,W. und Huth,F. (1974)
Morphologische Befunde bei Paraquatvergiftungen.
Klin. Wschr. 52, 657-671

11. Brigelius,R., Spöttl,R., Bors,W., Lengfelder,E., Saran, M. und Weser,U. (1974)
SOD activity of low molecular weight Cu^{2+}- chelates studied by pulse radiolysis.
FEBS Lett. 47, 72-75

12. Brigelius,R., Hartmann,H.-J., Bors,W., Saran.M., Lengfelder,E. und Weser,U. (1975)
Superoxide dismutase activity of $Cu(tyr)_2$ and Cu,Co-Erythrocuprein
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 739-745

13. Brigelius,R. und Hegner,D. (1979)
Paraquat-induced lipid peroxidation in isolated perfused rat liver
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, Suppl. R 51

14. Brigelius,R. und Lengfelder,E. (1979)
Influence of Cu-penicillamine on the paraquat toxicity: investigation of lipid metabolism in the isolated perfused rat liver. In:
"Metalloproteins, structure, molecular function and clinical aspects" Hrsg. U. Weser, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 150-156

15. Bus,J.S., Aust,S.D. und Gibson,J.E. (1974)
Superoxide and singlet oxygen catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat toxicity.
Biochem.Biophys. Res. Comm. 58, 749-755

16. Bus,J.E., Cagen,S.Z., Olgaard,M. und Gibson,J.E. (1976)
A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 35, 501-513

17. Bus,J.S., Aust,S.D. und Gibson,J.E. (1977)
Lipid peroxidation as a proposed mechanism for paraquat toxicity. In:
"Biochemical mechanisms of paraquat toxicity" Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York, S. 157-174

18. Bus,J.S. und Gibson,J.E. (1979)
Lipid peroxidation and its role in toxicology. In:
"Reviews in biochemical toxicology" Hrsg. Hodgson, Bend und Philpot, Elsevier, North Holland, S.125 ff

19. Butenandt,I., Mantel,K. und Fendel,H. (1974)
Paraquat-Vergiftung bei Kindern
Fortschr. Med. 92, 677-680

20. Cagen,S.Z., Janoff,A.S., Bus,J.S. und Gibson,J.E. (1976)
Effect of paraquat (methyl viologen) on liver function in mice
J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 222-228

21. Cagen,S.Z. und Gibson,J.E. (1977)
Liver damage following paraquat in selenium deficiency and diethylmaleate pretreated mice.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 40, 193-200

22. Calderbank,A. und Slade,P. (1976)
Diquat and Paraquat. In:
"Herbicides, chemistry, degradation and mode of action"
Hrsg. P.C.Kearney und D.D. Kaufman, Marcel Dekker,
New York und Basel, Vol. 2, S. 501-540

23. Cavalli,R.D. und Fletcher,K. (1977)
An effective treatment for paraquat poisoning. In:
"Biochemical mechanisms of paraquat toxicity" Hrsg.
Anne P. Autor, Academic Press, New York, S. 213-230

24. Ciccoli,L., Casini,A. und Benedetti,A. (1978)
Free radical damage produced by CCl_4 in the lipids of various rat tissues.
Agents and Actions, 8, S. 303-310

25. Colbeau,A., Nachbaur,J. und Vignais,P.M. (1971)
Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes.
Biochim. Biophys. Acta 249, 462-492

26. Crapo,J.D. und Tierney,F. (1974)
Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity
Am. J. Physiol. 226, 1401-1407

27. Crapo,J.D. (1977)
The role of the superoxide dismutases in pulmonary oxygen toxicity. In:
"Superoxide and Superoxide dismutase." Hrsg. A.M. Michelson, J.M. McCord und I.Fridovich, Academic Press
London, New York, San Francisco
S. 231-238

28. Cross,C.E., Reddy,K.A., Hasegawa,G.K., Chiu,M.M., Tyler,W.S. und Omaye,S.T. (1977)
Paraquat toxicity: Effects of selenium deficiency and anti-inflammatory drug pretreatments. In:
"Biochemical mechanisms of paraquat toxicity"

Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York
S. 201-211

29. Davies,D.S. und Davies,D.L. (1975)
Effect of D-propanolol and superoxide dismutase on paraquat reduction and adrenochrome formation by rat liver microsomes.
Fed. Proc. 33, 228

30. Demopoulos,H.B. (1973)
Control of free radicals in biologic systems
Fed. Proc. 32, 1903-1908

31. Dianzani,M.U. und Ugazio,G. (1978)
Lipid Peroxidation. In:
"Biochemical mechanisms of liver injury" Hrsg. T.F. Slater, Academic Press, London, New York, San Francisco. S. 669 ff

32. Di Luzio,N.R. (1973)
Antioxidants, lipid peroxidation and chemical induced liver injury
Fed. Proc. 32, 1875-1881

33. Doge,A.D. und Harris,N. (1970)
The mode of action of paraquat and diquat
Biochem.J. 118, 43-44

34. Falkay,G., Herczeg,J. und Sas,M. (1977)
Microsomal lipid peroxidation in human pregnant uterus and placenta
Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 843-851

35. Farrington,J.A., Ebert,M., Land,E.J. und Fletcher,K. (1973)
Bipyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radicals with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridylium herbicides.
Biochim. Biophys. Acta 314, 372-381

36. Fisher,H.K., Clemments,J.A. und Wright,R.R. (1973)
Pulmonary effects of the herbicide paraquat studied 3 days after injection in rats.
J. Appl. Physiol. 35, 268-273

37. Fisher,H.K. (1977)
Importance of oxygen and of pulmonary alveolar surfactant in lung injury by paraquat. In:
"Biochemical mechanisms of paraquat toxicity. Hrsg.: Anne P. Autor, Academic Press, New York, S. 57-69

38. Fletcher,K. und Wyatt,I. (1970)
The composition of lung lipids after poisoning with paraquat
Br. J. Exp. Path. 51, 604-610

39. Flohe,L., Loschen,G., Azzi,A. und Richter,Ch. (1977)
Superoxide radicals in mitochondria. In:
"Superoxide and Superoxide dismutases" Hrsg. A.M. Michelson, J.M. McCord und I.Fridovich, Academic Press London, New York, San Francisco. S. 323-334

40. Folch,J., Lees,M. und Sonestanley,G.H. (1957)
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. 226, 497-509

41. Fridovich,I. (1975)
Superoxide dismutase.
Ann. Rev. Biochem. 44, 147-159

42. Fridovich,I. (1978)
The biology of oxygen radicals
Science, 201, 875-880

43. Gardiner,A.J. (1972)
Pulmonary oedema in paraquat poisoning
Thorax 27, 132-135

44. Gibson,J.E. und Cagen,S.Z. (1977)
Paraquat induced functional changes in kidney and liver.
In: "Biochemcal mechanisms of paraquat toxicity" Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York, S. 117-136

45. Goldstein,B.D., Rozen,M.G., Quintavalla,J.C. und Amoruso,A. (1979)
Decrease in mouse lung and liver glutathione peroxidase activity and potentiation of the lethal effects of ozone and paraquat by the SOD inhibitor dimethylthiocarbamate.
Biochem. Pharmacol. 28, 27-30

46. Grabensee,B., Veltmann,G., Mürtz,R. und Borchard,F. (1971)
Vergiftung durch Paraquat
Deutsche Med. Wochenschrift 96, 498-506

47. Gray,J.I. (1978)
Measurement of lipid peroxidation
J. Amer. Oil Chem. Soc. 55, 539-546

48. Halliwell,B. (1977)
Superoxide and hydroxylation reactions. In: "Superoxide and Superoxide dismutase". Hrsg. A.M.Michelson, J.M. McCord und I.Fridovich, Academic Press, London, New York, San Francisco. S. 335-349

49. Hapke,H.J. (1975)
113. Dipyridinium-Verbindungen. In: Toxikologie für Veterinärmediziner, Hrsg. H.J. Hapke, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 371

50. Harley,J.B., Grinspan,S. und Root,R.K. (1977)
Paraquat suicide in a young woman: results of therapy directed against the superoxide radicals.
Yale J. Biol. Med. 50, 481-488

51. Hassan,H.M. und Fridovich,I. (1977)
Regulation of the synthesis of SOD in E. coli. Induction by methyl viologen.
J. Biol. Chem. 252, 7667-7672

52. Hassan,H.M. und Fridovich,I. (1978)
Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in E. coli.
J.Biol. Chem. 253, 8143-8148

53. Hatefi,Y. und Hanstein,W.G. (1970)
Lipid oxidation in biological membranes. I. Lipid peroxidation in submitochondrial particles and microsomes induced by chaotropic agents.
Arch. Biochem. Biophys. 138, 73-86

54. Heath,D. und Smith,P. (1977)
The pathology of the lung in paraquat poisoning. In: "Biochemical mechanisms of paraquat toxicity". Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York S. 39-55

55. Högberg,J., Orrenius,S. und Larson,R.E. (1975)
Lipid peroxidation in isolated hepatocytes
Eur. J. Biochem. 50, 595-602

56. Högberg,J., Orrenius,S. und O'Brien,P.J. (1975)
Further studies on lipid peroxide formation in isolated hepatocytes
Eur. J. Biochem. 59, 449-455

57. Högberg,J., Moldeus,P., Arborgh,B., O'Brien,P.J. und Orrenius,S. (1975)
The consequences of lipid peroxidation in isolated hepatocytes
Eur. J. Biochem. 59, 457- 462

58. Högberg,J. (1977)
Regulation and effects of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. In:
"Biological reactive intermediates. Formation, toxicity and inactivation".
Hrsg. D.J.Jollow, J.J.Kocsis, R.Snyder und H.Vainio
Plenum Press, New York and London. S.401-414

59. Ilett,K.F., Stripp,B., Menard,R.H., Reid,W.D. und Gilette,J.R. (1974)
Studies on the mechanism of the lung toxicity of paraquat.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 28, 216-226

60. Kehrer,J.P. und Autor,A.P. (1977)
Changes in the fatty acid composition of rat lung lipids during development and following age-dependent lipid peroxidation.
Lipids, 12, 596-603

61. Kehrer,J.P., Haschek,W. und Witschi,H.P. (1979)
Peracute toxicity of paraquat and diquat in 100 % oxygen
Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, A59/118

62. Kellogg,E.W.III. und Fridovich,I. (1975)
Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system
J. Biol. Chem. 250, 8812-8817

63. Kellogg,E.W.III und Fridovich,I. (1977)
Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide
J.Biol.Chem. 252, 6721-6728

64. Kimbrough,R.D. und Gaines,T.B. (1970)
Toxicity of paraquat to rats and its effects on rat lung
Toxicol. Appl. Pharmacol. 17, 679-690

65. Köster-Albrecht,D., Kappus,H. und Remmer,H. (1978)
Lipid peroxidation and cell damage in isolated hepatocytes due to Bromotrichlorometane
Toxicol. Appl. Pharmacol. 46, 499-505

66. Krebs,H.A. und Henseleit,K. (1932)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem 210, 33

67. Kuttan,R., Spall,R., Sipes,J.G., Meezan,E. und Brendl, K. (1979)
Effect of paraquat treatment on rat kidney basement membranes
Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, A 355

68. Lautenschlager,J., Grabensee,B. und Poettgen,W. (1974)
Paraquat-Intoxikation und isolierte aplastische Anämie
Dtsch. Med. Wochenschr. 99, 2348-2351

69. Ledwith,A. (1977)
Electron transfer reactions of paraquat. In:
"Biochemical mechanisms of paraquat toxicity. Hrsg.
Anne P. Autor, Academic Press, New York. S. 21-38

70. Lembeck,F. und Winne,D. (1965)
Die Auswertung von Versuchsergebnissen. In:
"Pharmakologisches Praktikum" Hrsg. F.Lembeck und D.
Winne, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 92 ff

71. Lott,P.F., Lott,J.W. und Doms,D.J. (1978)
The determination of paraquat
J. Chromatogr. Sci. 16, 390-395

72. Malmqvist,E., Grossmann,G., Ivemark,B. und Robertson,
B. (1973)
Pulmonary phospholipids and surface properties of al-
veolar wash in experimental paraquat poisoning
Scand. J. Resp. Dis. 54, 206-214

73. Mason,R.P. (1979)
Free radical metabolites of foreign compounds and their
toxicological significance
In: "Reviews in biochemical toxicology" Hrsg. Hodgson,
Bend und Philpot, Elsevier, North Holland. S. 151-200

74. May,H.E. (1973)
A kinetic assay of TNPH-dependent microsomal lipid
peroxidation by changes in difference spectra
Anal. Biochem. 55, 331-337

75. McCay,P.B., Gibson,D.D., Fong,K.L. und Hornbrook,K.R.
(1976)
Effect of glutathione peroxidase activity on lipid per-
oxidation in biological membranes
Biochim. Biophys. Acta 431, 459-468

76. McCord,J.M. (1979)
Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity
In: "Reviews in biochemical toxicology". Hrsg. Hodgson,
Bend und Philpot, Elsevier, North Holland. S.109-124

77. Michelson,A.M. (1977)
Toxicity of superoxide radical anions
In: "Superoxide and Superoxide dismutase". Hrsg. A.M.
Michelson, J.M.McCord und I.Fridovich, Academic Press
London, New York, San Francisco. S. 245-255

78. Miller,L.L. (1972)
History of isolated liver perfusion and some still unsolved problems
In: "Isolated liver perfusion and its applications". Hrsg. I.Bartosek, A.Guaitani und L.L.Miller, Raven Press, New York. S. 1-9

79. Montgomery,M.R. (1976)
Interaction of paraquat with the pulmonary microsomal fatty acid desaturase system
Toxicol. Appl. Pharmacol. 36, 543-554

80. Montgomery,M.R., Wyatt,I. und Smith,L. (1979)
Oxygen effects on active uptake and metabolism in rat lung
Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, A79/157

81. Montgomery,M.R. und Niewoehner,D.E. (1979)
Oxidant-induced alterations in pulmonary mixed function oxidation: acute effects of paraquat and ozone
J.Environ.Sci.Hlth C13, 205-219

82. Murray,R.E. und Gibson,J.E. (1974)
Paraquat dispostion in rats, guinea pigs, and monkeys
Toxicol. Appl. Pharmacol. 27, 283-291

83. Nielsen,H. (1978)
Reaction between peroxidized phospholipid and protein: I. Covalent binding of peroxidized cardiolipin to albumin
Lipids 13, 253-258

84. Nielsen,H. (1978)
Covalent binding of cardiolipin to γ-globulin and albumin depends on peroxidation
Chem.Phys.Lipids 22, 339-340

85. Nishiki,K., Oshino,N., Jamieson,D. und Chance,B. (1976)
Oxygen toxicity in the perfused rat liver and lung under hyperbaric conditions
Biochem.J. 160, 343-355

86. Noguchi,K. und Nakano,M. (1974)
Act of Ferrous ions on microsomal phospholipid peroxidation and related light emission
Biochim. Biophys. Acta 368, 446-455

87. Ohkawa,H., Ohishi,N. und Yagi,K. (1979)
Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction
Anal. Biochem. 95, 351-358

88. O'Neil,J.J. und Engelbrecht,F.M. (1977)
Increase of oxygen consumption and pentose pathway activity of rat lung slices by paraquat in the presence of glucose.
Fed. Proc. 36, 480

89. Paine,A.J. (1978)
Excited states of oxygen in biology: their possible involvement in cytochrome P_{450} linked oxidations as well as in the induction of the P_{450} system by many diverse compounds
Biochem.Pharmacol. 27, 1805-1813

90. Pasi,A. (Hrsg.) (1978)
The Toxicology of Paraquat, Diquat and Morfamquat
Hans Huber Publishers, Bern, Stuttgart, Vienna

91. Pederson,T.C. und Aust,S.D. (1975)
The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation
Biochim.Biophys.Acta 385, 232-241

92. Pfeifer,P.M. und McCayP.B. (1972)
Reduced Triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids
J.Biol.Chem. 217, 6763-6769

93. Pratt,I.S., Keeling,P.L. und Smith,L.L. (1979)
The effect of high concentrations of oxygen on the toxicity of paraquat and diquat in rats
Toxicol.Appl.Pharmacol. 48, A59/117

94. Recknagel,R.O. und Ghoshal,A.K. (1966)
Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning
Exp.Mol.Pathol. 5, 413-426

95. Richter,C., Azzi,A., Weser,U. und Wendel,A. (1977)
The action of $Cu(tyr)_2$ as a SOD model on hepatic microsomal demethylation
In:"Superoxide and Superoxide dismutase", Hrsg. A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, Academic Press London, New York, San Francisco, S. 375-385

96. Rose,M.S. und Smith,L.L. (1977)
The relevance of paraquat accumulation by tissues
In: "Biochemical mechanisms of paraquat toxicity"
Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York. S. 71-91

97. Ross,B.D. (Hrsg.) (1972)
"Perfusion Techniques in Biochemistry".
Clarendon press, Oxford

98. Ross,J.H., Gee,S.J. und Krieger,R.J. (1979)
Structure-activity correlation of paraquat homologues in the inhibition of Aldrin epoxidation by rat liver microsomes
Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, A80/159

99. Ross,J.H., Krieger,R.J. und Lim,L.D. (1979)
Herbicidal potency of paraquat homologues as a function of their physicochemical constants in duckweed
Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, A194/389

100. Roth,R.A., Wallace,K.B., Alper,R.H. und Bailie,M.D. (1979)
Paraquat treatment alters disposition of 5-hydroxy tryptamine and angiotensin by rat lung
Toxicol.Appl.Pharmacol. 48, A79/158

101. Sachs,L. (Hrsg.) (1974)
Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 109

102. Saito,K., Parker,W.B. und Menzel,D.B (1979)
Accumulation of paraquat and diquat by cultured type II pneumocytes
Toxicol.Appl.Pharmacol. 48, A58/116

103. Schimassek,H. (1968)
Möglichkeiten und Grenzen der Methodik, erläutert am Beispiel verschiedener Perfusionsmedien
In: "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber"
Hrsg. W. Staib und R.Scholz, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York S. 1-10

104. Scholz,R. (1968)
Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
In:"Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber"
Hrsg. W.Staib und R.Scholz, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York. S. 25-52

105. Sedgwick,B. und Hübscher,G. (1965)
Metabolism of phospholipids. IX. Phosphatidate Phosphohydrolase in rat liver
Biochim.Biophys.Acta 106, 63-77

106. Sharp,C.W., Ottolenghi,A. und Posner,H.S. (1972)
Correlation of paraquat toxicity with tissue concentration and weight loss of the rat
Toxicol.Appl.Pharmacol. 22, 241-251

107. Shu,H., Talcott,R.E., Rice,S.A. und Wei,E.T. (1979)
Lipid peroxidation and paraquat toxicity
Biochem.Pharmacol. 28, 327-331

108. Sies,H. und Summer,K.H. (1975)
Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver
Eur.J.Biochem. 57, 503-512

109. Simons,R.S., Jackett,P.S., Carroll,M.E.W. und Lowrie, D.B. (1976)
Superoxide independence of paraquat toxicity in E. coli.
Toxicol.Appl.Pharmacol. 37, 271-280

110. Smith,L.L. und Rose,M.S. (1977)
Biochemical changes in lung exposed to paraquat
In: "Biochemical mechanisms of paraquat toxicity"
Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York, S. 187-199

111. Smith,P. und Heath,D. (1976)
Paraquat
CRC Critical Reviews in Toxicology, 4, 411-445

112. Spector,D.S., Whorton,D., Zachary,J. und Slavin,R. (1978)
Fatal paraquat poisoning: tissue concentrations and implications for treatment
Johns Hopkins Med. J. 142, 110-113

113. Steffen,C. und Netter,K.J. (1979)
On the mechanism of paraquat action on microsomal oxygen reduction and its relation to lipid peroxidation
Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 593-602

114. Steffen,C., Muliawan,H. und Kappus,H. (1980)
Lack of in vivo lipid peroxidation in experimental paraquat poisoning
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 241-243

115. Szarkowska,L. und Klingenberg,M. (1963)
On the role of ubichinon in mitochondria:spectrophotometric and chemical measurements of its redox reactions
Biochem. Z. 338, 674-697

116. Tam,B.K. und McCay,P.B. (1970)
Reduced Triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alteration of membrane phospholipids
J.Biol.Chem. 245, 2295-2300

117. Tappel,A.L. (1965)
Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by Vit.E and selenium
Fed.Proc. 24, P 73

118. Tappel,A.L. (1973)
Lipid peroxidation damage to cell components
Fed.Proc. 32, P. 1870

119. Thurman,R.G., Reinke,L.A. und Kaufman,F.C. (1979)
The isolated perfused rat liver: A model to define biochemical mechanisms of chemical toxicity
In: "Reviews in biochemical toxicology
Hrsg. Hodgson, Bend und Philpot, Elsevier, North Holland, S. 249-285

120. Tierney,D.F. (1971)
Lactate metabolism in rat lung tissue
Arch.Intrn.Med. 127, 858-860

121. Van Dijk,A., Maes,A.A., Drost,R.H., Douze,J.M.C. und van Heyst, A.N.P. (1975)
Paraquat poisoning in man
Arch.Toxicol. 34, 129-136

122. Van Osten,G.K. und Gibson,J.E. (1975)
Effect of paraquat on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in the rat
Food Cosmet. Toxicol. 13, 47-54

123. Von der Hardt,H. und Cardesa,A. (1971)
Die histopathologischen Frühveränderungen nach Paraquat-Intoxikation
Klin. Wschr. 49, 544-550

124. Wegler,R. und Eue,L. (1970)
5.13.3. Quartäre heterozyklische Ammoniumverbindungen
In: Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Hrsg. R.Wegler, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Newe York, S. 327

125. Wills,E.D. und Wilkinson,A.E. (1966)
Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release
Biochem.J. 99, 657-666

126. Witschi,H., Hirai,K.I. und Cote,M.G. (1977)
Primary events in lung following exposure to toxic chemicals
In: "Biochemical mechanisms of paraquat toxicity"
Hrsg. Anne P. Autor, Academic Press, New York S. 1-20

127. Youngman,R.A., Dodge,A.D., Elstner,E.F. und Lengfelder E. (1979)
Inhibition of paraquat phytotoxicity by a novel copper chelate with superoxide dismutase activity
Experientia 35, 1295

128. Zimmermann,R., Flohe,L., Weser,U. und Hartmann,H.-J. (1973)
Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membranes of rat liver mitochondria by superoxide dismutase
FEBS Lett. 29, 117-120

Danksagung

Für die Aufnahme in seinem Institut sowie für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung danke ich Herrn Professor Dr. D. Hegner herzlichst.

Frau Dr.rer.nat. Regina Brigelius gilt mein aufrichtiger Dank für die Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Der tierärztlichen Fakultät der Universität München,vor allem dem Dekanat,bin ich zu verbindlichem Dank verpflichtet für die Erteilung eines Studienplatzes zur Promotion.

Lebenslauf

Mohamed Ayman Tawfiek Mohamed H A S H E M	geb. am 27. August 1950 in Alexandria,Ägypten
Eltern	Tawfiek Mohamed Hashem,Kaufmann und dessen Ehefrau Naiema Mohamed Abdu
Grundschule	von 1956 - 1962 in Khartoum,Sudan
Mittelschule	von 1962 - 1965 in Kairo,Ägypten
Oberschule	von 1965 - 1968 in Kairo,Ägypten 1968 Erlangung des Reifezeugnisses im naturwissenschaftlichen Zweig (Abitur)
Hochschule	von 1968 - 1975 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Kairo,Ägypten 1975 Staatsexamen und Erlangung des akademischen Grades "Bachelor in veterinary sciences (B.V.Sc.)"
Approbation	September 1975 in Kairo,Ägypten
Dezember 1975 bis Oktober 1976	Erlernung der deutschen Sprache an verschiedenen Institutionen in Hamburg,B.R.D.
Oktober 1976	Immatrikulation zum Studium der Tiermedizin an der Universität München
April - Mai 1978	Ablegung einer "Kenntnisprüfung" in den Fächern Pathologie,Pharmakologie und Toxikologie sowie Physiologie und physiologische Chemie als Voraussetzung zur Promotion
Dissertation	seit Juli 1978 mit der vorliegenden Arbeit befaßt
verheiratet	seit 5. März 1979 mit der deutschen Staatsangehörigen Rosemarie,geb. Schwaiger